

**Über Mechanismen der Initiation,
Elongation und Termination
in der Transcription**

Rolf Schäfer

1972

AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. A. BUTENANDT

ÜBER MECHANISMEN DER
INITIATION, ELONGATION UND TERMINATION
IN DER TRANSCRIPTION

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
ROLF SCHÄFER
AUS BASEL (SCHWEIZ).



Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 1972

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Zillig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt

Die vorliegende Arbeit wurde unter der
Anleitung von Herrn Prof. Dr. W.Zillig
im Max-Planck-Institut für Biochemie,
München, durchgeführt.

Herrn Professor Dr.A.Butenandt und
Herrn Professor Dr.W.Zillig danke ich
sehr herzlich für die grosszügige Förde-
rung der Arbeit.

INHALTSUEBERSICHT

	S.
Abkürzungsverzeichnis	6
Erläuterungen von Begriffen	8
A. EINLEITUNG	10
B. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	
I. Die Termination	
1. Die Salztermination	
a) Kinetik der RNA-Synthese	14
b) Analyse des blockierten Endzustandes der RNA-Synthese bei niedriger Ionen- stärke	28
c) Analyse der an T4-, T5- und T7-DNA bei niedriger und hoher Ionenstärke synthe- tisierten RNA-Spezies	41
2. Die Blockierung der Transcription durch Faktoren (Proteine)	
a) Terminations-Faktor ρ	47
b) Terminations-Faktor κ	59
II. Die Initiation und die Elongation	
1. Die Initiation	
a) Zwei unterscheidbare Zustände in der Initiation	72
b) Ein neues Modell des Promoters	80
2. Die Elongation	89
III. Anhang	
1. Eine neue Polyribonukleotidpyrophosphorylase aus E.coli	92
2. Die Faktoren η und χ	104

IV.	<u>Material und Methoden</u>	S.
1.	Präparative Methoden	
a)	Die Isolierung der Faktoren κ , ρ , χ und eines neuen Enzyms: Poly-ribonukleotidpyrophosphorylase	108
b)	Die Isolierung von Faktor η	112
c)	Die Isolierung von C14- und S35-Enzym	113
d)	Züchtung von Bakterien (E.coli MRE 600)	117
e)	Zucht und Reinigung der Bakteriophagen T4, T5 und T7 (T5 auch mit H3-markierter DNA)	118
f)	Isolierung der Phagen-DNA	119
g)	Isolierung des aktiven Komplexes	119
2.	Quantitative Bestimmungsmethoden	120
3.	Analytische Methoden	122
4.	Spezielle Methoden	123
5.	Lösungen	124
6.	Bezugsquellen	126
V.	<u>Zusammenfassung</u>	127
VI.	<u>Literaturverzeichnis</u>	132
	Lebenslauf	137

ABKUERZUNGSVERZEICHNIS

DNA = DNS	Desoxyribonukleinsäure
T4-DNA	Desoxyribonukleinsäure des Bakteriophagen T4
T5-DNA	Desoxyribonukleinsäure des Bakteriophagen T5
T7-DNA	Desoxyribonukleinsäure des Bakteriophagen T7
RNA = RNS	Ribonukleinsäure
m-RNA	Messenger-RNA (Boten-RNA)
t-RNA	Aminotransfer-RNA (s-RNA, lösliche RNA)
w-RNA	Waldhof-RNA, alkalisches Hydrolysat von Hefe-RNA, durchschnittliche Kettenlänge 20-25 Ribonukleotidreste
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
CTP	Cytidin-5'-Triphosphat
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
XDP	Ribonukleosiddiphosphate
XMP	Ribonukleosidmonophosphate
γ -P32-XTP	P32-Markierung in γ -Position eines Triphosphates
H3, C14-XTP	H3-,C14-Isotope in einem Triphosphat
RNAase	Ribonuklease
DNAase	Desoxyribonuklease
Ealt.	Alteriertes Enzym
Emod.	Modifiziertes Enzym
	(Chemisch veränderte Enzyme aus E.coli nach Infektion durch den Bakteriophagen T4), (65,66)
E	DNA-abhängige RNA-Polymerase, nicht gesättigt mit dem Initiationsfaktor σ
$E\sigma$	Vollenzym, Holoenzym
PC-E	Phosphorylcelluloseenzym, Minimalenzym, core-Enzym = Holoenzym minus σ
UE	Untereinheiten (β' , β , α , σ) des Enzyms
PVC	Polyvinylchlorid
SDS	Natriumdodecylsulfat (anionogenes Tensid)
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPK	Phosphoenolpyruvat-Kinase
PME	Phosphomonoesterase
PDE	Phosphodiesterase
NS	niedrige Ionenstärke
MS	mittlere Ionenstärke
HS	hohe Ionenstärke
LE	Leseinheit (Operon)
PP	Pyrophosphat
RP	Ribonukleotidpyrophosphorylase
EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure
MG	Molekulargewicht
UpM	Umdrehungen pro Minute
SSC	Hybridisierungspuffer
TCA	Trichloressigsäure

PC-Cellulose	Phosphorylcellulose
DEAE-Cellulose	Diäthyl-aminoäthyl-Cellulose
Tris	Tris-Oxymethyl-aminomethan
BSA	Rinderserumalbumin
PEG	Polyäthylenglycol
$s^{0}_{20,w}$	Svedberg-Einheit (10^{-13} sek., bezogen auf Wasser und 20°C.)
MOI	multiplicity of infection
w/v	Gewichtsprozent
v/v	Volumenprozent
cpm	Impulse pro Minute (gemessene)
dpm	Impulse pro Minute (reelle)
C	Curie
M	Molarität
m	milli
μ	mikro
SS-DNA	Einsträngige, geschmolzene, denaturierte DNA.
W	Watt
V	Volt
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)- Benzol
n-	nano-
O.D.	Optische Dichte
Kompl.	Komplex
Std.	Stunden

ERLÄUTERUNGEN VON BEGRIFFEN

1. KONSEKUTIVE INITIATION

Unter konsekutiver Initiation, im Gegensatz zur Reinitiation, soll die sukzessive primäre Initiation der Synthese mehrerer RNA-Moleküle durch mehrere RNA-Polymerase-Moleküle von einem Initiationsort aus verstanden werden.

2. REINITIATION

Enzymmoleküle, die nach Erreichen des Terminationsortes einer Leseinheit unter Freisetzung der synthetisierten RNA von der DNA abgehen und weitere Initiationsakte vollziehen, reinitiiieren.

3. MONOMERES UND DIMERES ENZYMMOLEKÜL

In Abhängigkeit der Salzkonzentration liegt die RNA-Polymerase in monomerer oder dimerer Form in wässriger Lösung vor (26, 27). Das Molekulargewicht des monomeren Moleküls beträgt einschliesslich des Initiationsfaktors σ 4.8×10^5 .

4. TERMINATION UND BLOCKIERUNG DER RNA-SYNTHESE

Der Prozess der zyklischen RNA-Synthese (Synthese, bei der Reinitiation stattfindet) schliesst die Termination ein. Von Blockierung in der Transcription wird dann gesprochen, wenn ein Endzustand erreicht wird, bei dem keine RNA-Synthese mehr erfolgt.

5. TRANSCRIPT

Unter Transcript versteht man eine durch Polymerase an einer DNA synthetisierte RNA-Kette.

A. EINLEITUNG

Die Erforschung der Grundlagen der Lebensvorgänge, z.B. der Zellteilung, der Vererbung oder der Differenzierung, wird heute zu einem grossen Teil mit molekularbiologischen Methoden vorangetrieben, d.h. lebenswichtige Prozesse werden auf das Zusammenspiel von Mikro- und Makromolekülen, die der klassischen Chemie und Physik schon lange als Bausteine bekannt sind, reduziert.

Schon vor ca. 40 Jahren konnte Avery (1) als materiellen Träger der Erbanlagen die DNA herausstellen. Die Sequenz von Tripletts legt durch Variation von vier verschiedenen Nukleotiden, aus der die DNA besteht, eine bestimmte genetische Information fest. Während der Zellteilung wird durch Replikation der DNA die genetische Information an die Tochterzellen weitergegeben.

Als zweite wichtige Klasse von Makromolekülen seien die Proteine erwähnt, die einerseits als Bausteine der Zelle teilweise die Struktur eines Organismus bestimmen, andererseits als Enzyme mannigfaltige Aufgaben der Zelle bewältigen.

Die Struktur eines Proteins, die durch die Sequenz einer grossen Zahl von Aminosäure-Resten, die zwanzig diskreten Spezies angehören, prädestiniert ist, bestimmt seine Funktion.

Die Frage nach der Kausalität zwischen Information (DNA) einerseits, Struktur und Funktion (Proteine) andererseits, ist teilweise durch das von Crick (2,3) postulierte "Zentrale Dogma" beantwortet:

Die Expression der genetischen Information erfolgt in zwei Schritten, erstens der Transcription, in der die in der DNA gespeicherte Information in die funktionelle Form der m-RNA übersetzt wird (4) und zweitens der Translation, in der die funktionelle Form der Information

mittels Ribosomen, t-RNA, an t-RNA gebundenen, aktivierten Aminosäure-Resten m-RNA-triplettspezifisch im synthetisierten Protein ausgedrückt wird (5). Im Translationssystem sind zusätzlich sehr viele Faktoren beteiligt.

Der erste Schritt, die Transcription, erfolgt unter der katalytischen Wirkung eines Enzymes, der DNA abhängigen RNA-Polymerase (E.C. 2.7.7.6).

Dieses Enzym, erstmals von Hurwitz (6) und Weiss (7) nachgewiesen, in grösseren Quantitäten aus einfachen Lebensformen, z.B. Bakterien (11), isolierbar, ist nicht zellstrukturgebunden und somit in vitro strukturell und funktionell analysierbar (10).

An dieser Stelle sei auf einen wichtigen Gesichtspunkt hingewiesen:

Die Untersuchung von Proteinen, also auch Enzymen, erfolgt in wässriger Phase und einer Umgebung, die sich wesentlich von der in der Zelle unterscheiden kann. pH-Werte und Salzbedingungen z.B. sind in der lebenden Zelle kaum messbar, sodass in vitro-Untersuchungen nur bezüglich dieser beiden Parameter zwar oft klare Resultate bringen, jedoch müssen Rückschlüsse auf den Ablauf in vivo sehr kritisch betrachtet werden.

Die DNA abhängige RNA-Polymerase, auch Transcriptase oder Nukleosidtriphosphat: RNA-Nukleotidyltransferase genannt, interagiert mit der DNA und heteropolykondensiert vier Ribonukleosidtriphosphate, die energiereiche Substrate darstellen, unter Pyrophosphateliminierung zu einer zum codogenen Strang der DNA (18) komplementären vom 5'- zum 3'-Hydroxylende wachsenden RNA (8,9).

Auf der Ebene der Translation und auf der Ebene der Transcription wird reguliert (12-17, 22, 23). Die Prozesse der Transcription müssen mit hoher Präzision ablaufen, d.h. die Information in der funktionellen Form muss vollständig und sinnvoll dargestellt werden.

Exakte Synthese, Erkennung der Orte an der DNA, an denen die RNA-Synthese beginnen muss (Bindungs- und Initiationsorte, 19-21), Orte, an denen die Synthese abbricht (Terminationsorte), Strangselektion (18), lassen auf eine komplizierte Struktur der RNA-Polymerase schliessen; sie besteht in der Tat aus mehreren Untereinheiten (25).

Dazugehörige, regulative Faktoren, z.B. Repressoren oder Terminationsfaktoren (24), gehen bei der Enzym-Isolierung verloren und müssen mit anderen Methoden aus Zellhomogenaten isoliert werden.

Vermutlich existieren noch viele, zur Zeit unbekannte, die Transcription regulierende Faktoren in Bakterienzellen.

Folgerichtig differenzierte man in vitro diverse Teilschritte in der Transcription:

Primäre Bindung, Initiation, Elongation und Termination.

Unter primärer Bindung versteht man die reversible Interaktion des Enzyms mit präferentiellen Stellen der DNA, den Bindungsstellen.

Als Initiation bezeichnet man die Summe der der Bindung folgernden Reaktionsschritte bis zur Kondensation der 2 ersten Nukleotidreste. Der Initiationsort ist dem Bindungsort benachbart oder ist mit diesem identisch.

Die Elongation über ein oder mehrere Cistren der DNA schliesst mit hoher Geschwindigkeit an die Initiation an.

Auf die Elongation, die eigentliche RNA-Synthese, folgt zwingend die Termination. Sie bedeutet Kettenabbruch an einem bestimmten Ort der DNA, dem Terminationsort.

Die Gesamtheit der erwähnten Orte an der DNA stellt eine Leseinheit (Operon) dar. Die DNA besteht aus mehreren, beziehungsweise sehr vielen Operons.

Während die Teilreaktionen primäre Bindung (28-31), Enzym-Substrat-Interaktion (20,32), Initiation und Elongation (8, 20, 25, 33-36) vielen Analysen unterzogen wurden, ist über den Mechanismus der Termination (24, 37, 38) nicht sehr viel bekannt.

Die Differenzierung verschiedener Terminationsarten (auch Blockierung) mit und ohne Faktoren (Proteine) ist Gegenstand des ersten Abschnittes der vorliegenden Arbeit. Bei der Aufarbeitung des Faktors ρ wurde ein neuer, die Transcription blockierender Faktor (κ) isoliert und charakterisiert.

Das Studium der Termination erforderte ein Eingehen auch auf die Initiation und Elongation, die Themen des zweiten Abschnittes sind. In der Initiation wurden zwei neue, unterscheidbare Zustände gefunden. Ausserdem wird ein neues Modell des Promoters beschrieben.

Bei der Aufarbeitung der Blockierungsfaktoren ρ und κ aus E.coli wurde eine neue Polyribonukleosidpyrophosphorylase isoliert und charakterisiert. Zwei weitere neue Faktoren, die im Transcriptionssystem aktiv sind, werden zusammen mit der obigen Pyrophosphorylase im Anhang der Arbeit beschrieben.

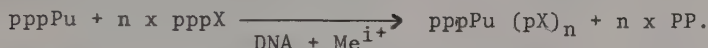
B. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

I. Die Termination

1. Die Salztermination

a) Kinetik der RNA-Synthese

Die von der DNA abhängigen RNA-Polymerase katalysierte Heteropolykondensationsreaktion kann wie folgt zusammengefasst werden (40):

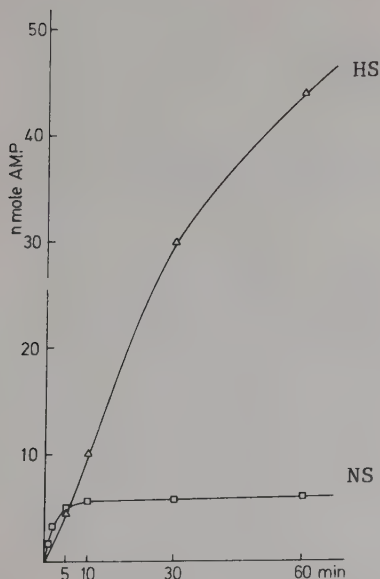


pppPu(pX)_n ist das Produkt, die RNA. Sie wird in Anwesenheit der DNA und bestimmten Ionen (Me^{i+}): Mg^{2+} oder Mn^{2+} bzw. Co^{2+} , zusätzlich NH_4^+ oder K^+ , aus den Ribonukleosidtriphosphaten ATP, UTP, GTP, CTP (pppX) unter Pyrophosphateliminierung (PP) synthetisiert, wobei der Kettenbeginn jeweils ein Purinribonukleosidtriphosphatrest ist (Pu).

Abb. 1:

RNA-Synthesekinetik bei hoher und niedriger Ionenstärke.

Aus dreifachen NS- und HS-T5-Standardansätzen wurden zu verschiedenen Zeiten nach Inkubation bei 37°C. 0.1 ml Aliquote entnommen und zum Zählen der eingebauten Radioaktivität in säurefällbare RNA präpariert.



Die RNA-Synthesekinetik in Abhängigkeit von der Ionenstärke $\mu = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$ liefert zwei extreme Funktionen: eine schon nach kurzer Zeit ins Plateau führende Kinetik bei niedriger Ionenstärke (0.05 M NH_4^+ , 0.006 M Mg^{2+} , $\mu < 0.1$) und eine Kinetik bei hoher Ionenstärke (0.13 M NH_4^+ , 0.07 M Mg^{2+} , $\mu = 0.37$), die auch nach Stunden nicht zum Erliegen gekommen ist (38), Abb.1, und in der viele identische RNA-Kopien pro Leseinheit synthetisiert werden (39, 46).

Variiert man die Ionenstärke innerhalb beider Extrema, so erhält man intermediäre Funktionen (38).

Das frühzeitige Abbrechen der RNA-Synthese bei niedriger Ionenstärke wurde als Inaktivierung des Enzyms gedeutet (38,41). Allerdings muss unter diesen Bedingungen die Inaktivierung als reversibel betrachtet werden, denn nach Erhöhung der Ionenstärke setzt die Synthese wieder ein, was eine Reaktivierung des Enzyms bedeutet (38).

Zwei andere Interpretationen obigen Phänomens wären die folgenden:

entweder wird das Enzym an bestimmten Orten der DNA bei niedriger Ionenstärke blockiert, oder es wird durch die synthetisierte RNA blockiert, wobei nicht auszuschliessen ist, ob Enzym, DNA und RNA einen Komplex bilden oder nur Enzym und RNA. Ausserdem erhebt sich bei der ersten Annahme die Frage, an welchen Orten der DNA das Enzym blockiert wird, an unspezifischen Orten entlang der gesamten Leseinheiten oder an spezifischen Orten, den Enden der Leseinheiten oder auch Terminationsorten, Abb.2.

Abb.2: Modelle der Termination in der Transcription bei niedriger Ionenstärke.

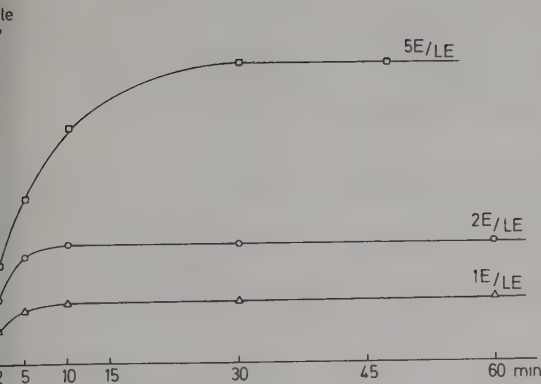
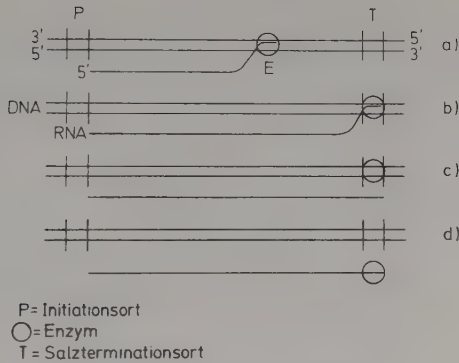


Abb.3:

Synthesekinetiken bei niedriger Ionenstärke in Abhängigkeit von der Enzymmenge.

Aus dreifachen NS-T5-Standardansätzen, die normale, doppelte und fünffache Enzymmenge enthalten, wurden 0.1 ml Aliquote nach diversen Zeiten der Inkubation bei 37°C. entnommen.

Die Frage nach der Spezifität der Orte an der DNA, an denen die RNA-Synthese bei niedriger Ionenstärke abbricht, lässt sich durch Kinetiken in erster Näherung beantworten. Verfolgt man die Kinetiken der RNA-Synthese bei niedriger Ionenstärke in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration im Ueberschuss von DNA, so stellt man fest, dass erstens die erreichte Plateauhöhe direkt proportional der Enzymmenge ist (Abb.3), und dass zweitens das Plateau für verschiedene Mengen Enzym nach fast gleicher Zeit eintritt. Abweichungen für sehr grosse Mengen Enzym ("Ueberschuss über DNA") hängen mit der Initiation zusammen und werden im zweiten Teil der Arbeit erörtert.

Man kann die Geschwindigkeit der RNA-Synthese (Elongation), die in vitro durchschnittlich 60 Nukleotide pro Sekunde beträgt (45 und 58), auf verschiedene Weise erniedrigen, z.B. durch Erniedrigung der Konzentration eines Substrates im Syntheseansatz, durch Zugabe minimaler Mengen Actinomycin oder durch Erniedrigung der Inkubationstemperatur. Actinomycin bindet reversibel an DNA (42), sodass es die mit der Transcription verbundene Translocation des Enzyms entlang der DNA nicht absolut unterbindet, sondern in kleinen Schritten erlaubt.

Substratkonzentrationserniedrigung und Temperaturerniedrigung bedeuten thermodynamisch Geschwindigkeitserniedrigungen.

Mit diesen Techniken kann man zeigen, dass bei Geschwindigkeitserniedrigungen nach verschiedenen Zeiten die gleichen Plateauwerte erreicht werden, ein Hinweis, dass das Enzym bis zu definierten Orten an der DNA RNA synthetisiert, Abb.4.

Heparin ist ein bekannter polyanionischer Enzyminhibitor (27). Heparin inaktiviert wahrscheinlich als Matrizen-analogon Enzym im freien Zustand und partiell auch wäh- rend des Initiationsprozesses, nicht aber während der Elongation (19).

Erzwingt man ein statistisches Arretieren von Enzym nach begonnener Synthese, indem man CTP in limitierenden Mengen anbietet, so zeigt sich, dass nach Heparin-Zugabe und nachträglicher CTP-Zugabe in üblicher Konzentration das gleiche Plateau erreicht wird, wie bei von vorn-herein ausreichender Menge von CTP in Abwesenheit von Heparin. Jedoch findet man keine Wiederaufnahme der Synthese von RNA an T4-, T5- und T7-DNA nach Erhöhung der Ionenstärke im "Niedrig-Salzplateau" unter Heparin (38), Abb.5.

Abb.4 a:

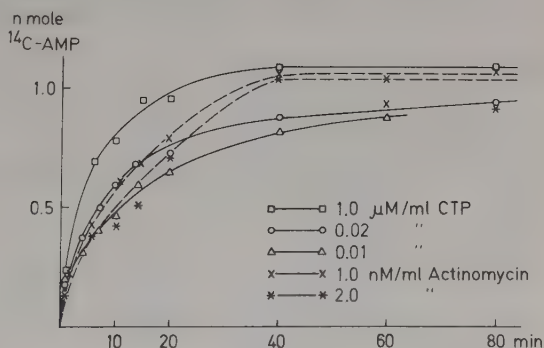


Abb. 4 b:

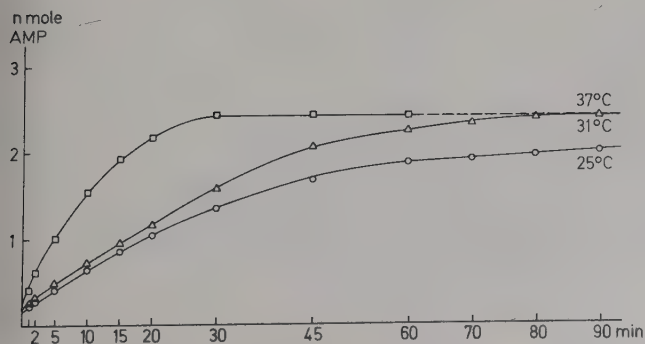


Abb.4a: Synthesekinetiken bei niedriger Ionenstärke
(Variation der Synthesegeschwindigkeit durch
Actinomycin oder CTP).

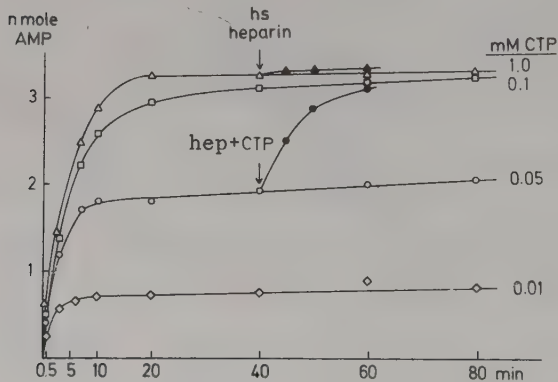
Aus doppelten NS-T5-Standardansätzen, bei denen die Geschwindigkeit der RNA-Synthese durch Actinomycin erniedrigt wurde, entnahm man nach verschiedenen Zeiten der Inkubation bei 37°C. 0.025 ml Aliquote.

Die limitierende Menge CTP, die die Synthesegeschwindigkeit erniedrigte, aber dennoch nicht das vorzeitige Abbrechen der Synthese durch Substratverbrauch verursachte, wurde dadurch erreicht, dass die Enzym- und DNA-Menge des Standardansatzes in einem zehnfachen NS-Synthesemix vorlag. Die Aliquote waren entsprechend zehnfach grösser, nämlich 0.25 ml.

Abb.4b: Synthesekinetiken bei niedriger Ionenstärke und
verschiedenen Inkubationstemperaturen.

Aus doppelten NS-T7-Standardansätzen wurden 0.05 ml Aliquote nach verschiedenen Zeiten der Inkubation bei 37°C., 31°C. und 25°C. entnommen.

Abb.5 :



Synthesekinetiken bei niedriger Ionenstärke mit limi-
tierenden Mengen CTP.

Aus fünffachen NS-T5-Standardansätzen mit verschiedenen CTP-Konzentrationen, die bei 37°C. inkubiert wurden, entnahm man nach diversen Zeiten 0.1 ml Aliquote. In zwei Kinetiken (0.05 mM CTP und 1.0 mM CTP) wurden nach 40 Minuten die

CTP-Konzentration unter gleichzeitiger Zugabe von 50 μ g Heparin auf 1 mM erhöht resp. unter gleichzeitiger Heparinzugabe die Salzkonzentration auf die der hohen Ionenstärke erhöht, und weitere Aliquote von 0.1 ml den Syntheseansätzen entnommen.

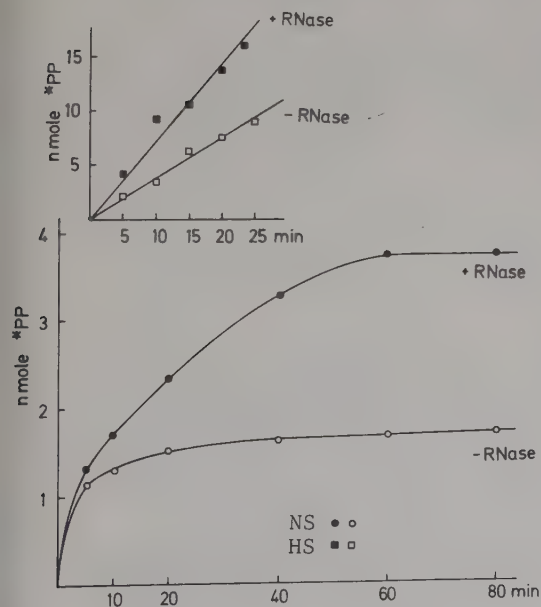
Allein dies zeigt schon, dass bei niedriger Ionenstärke die RNA-Synthese bis zu definierten Orten an der DNA erfolgt, an denen das Enzym arretiert wird. Das erste Modell (Zeichnung a) in Abbildung 2) kann also ausgeschlossen werden.

Wird in einem Syntheseansatz ein Substrat eingesetzt, das γ -P32 markiert ist, so lässt sich die RNA-Synthese durch Bestimmung des freiwerdenden markierten Pyrophosphates verfolgen, auch dann, wenn durch RNAase im Ansatz die jeweils synthetisierte RNA degradiert wird, Abb.6.

Abb.6:

Synthesekinetik bei niedriger und hoher Ionenstärke durch Messung der Pyrophosphatakkumulierung.

Aus dreifachen NS- und HS-T5-Standardansätzen mit und ohne pankreatische RNAase (50 μ g/ml) wurden zu diversen Zeiten nach Inkubation bei 37°C. 0.1 ml Aliquote entnommen. Die Markierung war γ -P32 ATP.DNA, RNA, Enzym und freie Nukleosidtriphosphate wurden vom Pyrophosphat abgetrennt (siehe Material und Methoden).



Im Widerspruch zu Krakow's Schlüssen (43) werden auch unter diesen Bedingungen die typischen Abläufe der Kinetiken bei niedriger und hoher Ionenstärke erkennbar, d.h., die Interpretation, dass die Arretierung auf Produkthemmung zurückzuführen sei (Zeichnung 1, 2 und 4 in Abbildung 2), wird fragwürdig. Der niedrigere Plateauwert bei niedriger Ionenstärke in Abwesenheit von RNAase im Ansatz kann durch die Bindung von Enzymmolekülen an schon synthetisierte RNA zustande kommen, die somit für die Synthese nicht mehr verfügbar sind.

Allerdings ist eine sehr wichtige Frage offengeblieben, nämlich der quantitative Aspekt der Kinetik bei niedriger Ionenstärke:

Initiiert jedes Enzymmolekül nur einmal, oder gibt es auch Moleküle, die an einer Leseinheit der Matrize mehrmals initiieren?

Mit der Technik der Kettenanfangsmarkierung durch γ -P32 ATP oder GTP und der zusätzlichen Markierung eines weiteren Nukleotides (Isotop in stabiler Position) lassen sich Kettenlängen und Anzahl synthetisierter RNA-Ketten berechnen.

Unter solchen Bedingungen wurden Kinetiken unter verschiedensten Bedingungen an den Matrizen T4, T5 und T7 produziert, Abb. 7.

Abgesehen davon, dass die Kinetik des Beginnens neuer RNA-Ketten (P32-Kinetik) parallel zur Nettosynthese verläuft, dies hängt mit der Initiation bei niedriger Ionenstärke zusammen und wird im zweiten Teil der Arbeit diskutiert, kann man aus der Menge von incorporiertem γ -P32 errechnen, dass im Plateau der RNA-Synthese höchstens ein Enzymmolekül (monomere Partikel) eine Kette anfängt. Reinitiationen sind also bei niedriger Ionenstärke ausgeschlossen (Zeichnung a).

Abb. 7a:

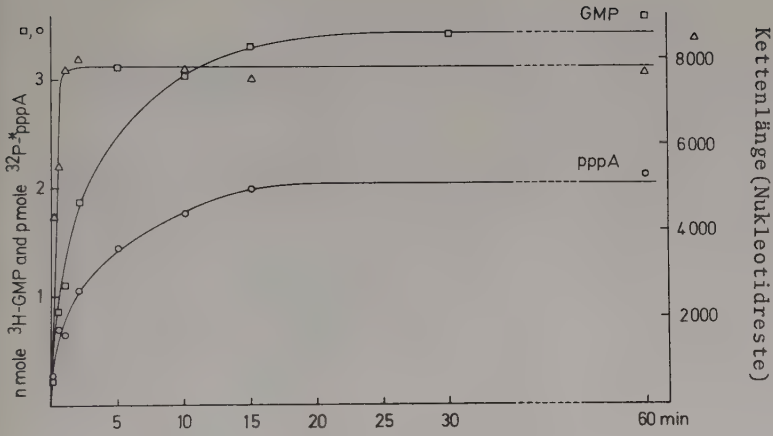


Abb. 7b:

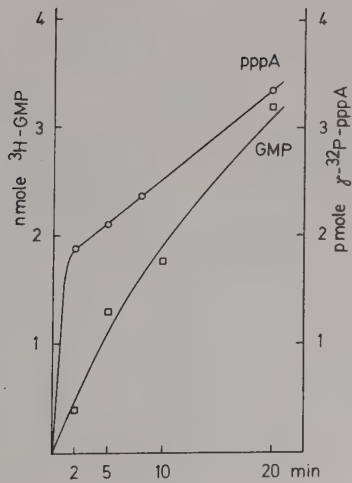


Abb. c:

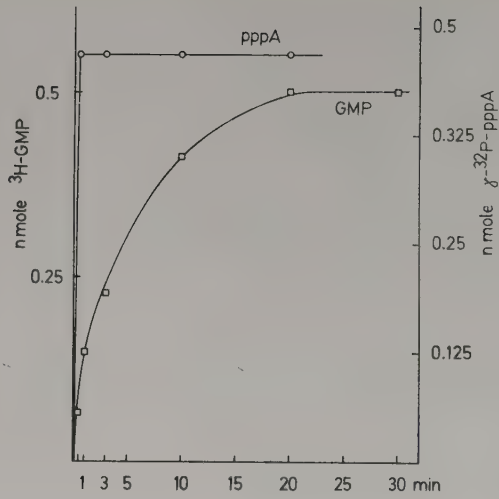


Abb. d:

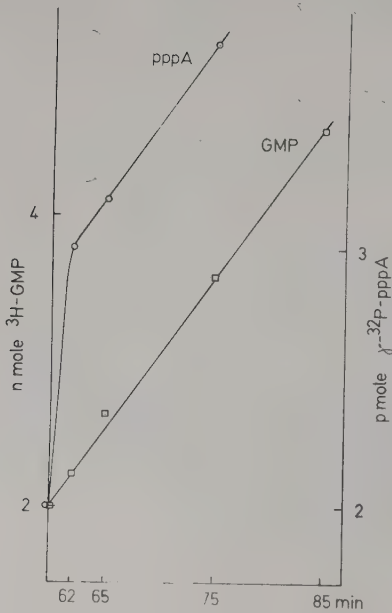


Abb. e:

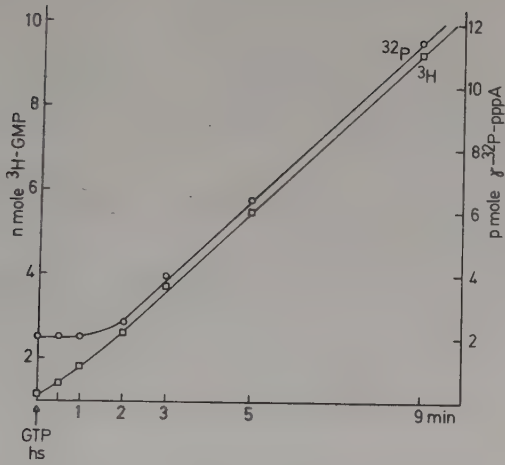


Abb. f:

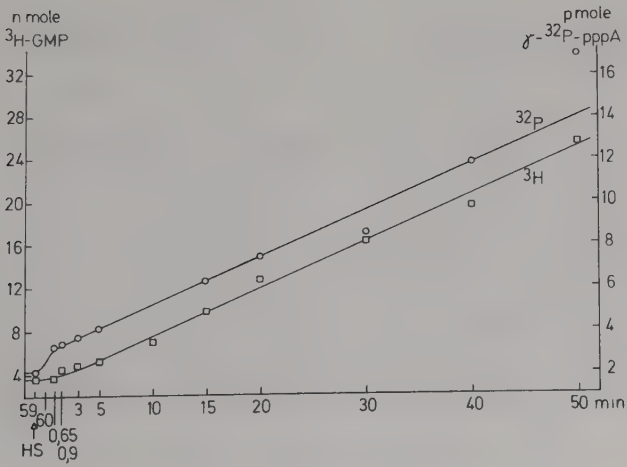


Abb. 7: Kinetik der Initiation und der RNA-Synthese mit T4- und T5-DNA bei verschiedener Ionenstärke.

- a) Ein achtfacher NS-T4-Standardansatz wurde bei 37°C. inkubiert. 0.25 ml Aliquote wurden nach verschiedenen Zeiten entnommen. Die Kinetik des Kettenwachstums incl. der durchschnittlichen Kettenlänge ergibt sich durch Rechnung der Anzahl der angelegten Kettenanfänge und der incorporierten Nukleotidreste.
- b) Aus einem doppelten HS-T5-Standardansatz wurden nach diversen Zeiten der Inkubation bei 37°C. 0.1 ml Aliquote entnommen.
- c) Wie Ansatz b), mit dem Unterschied, dass Vorsubstratzugabe DNA und Enzym nach fünf Minuten Präinkubation weitere fünf Minuten mit 50 µg Heparin inkubiert wurde (Nullwert).
- d) Wie Ansatz b), mit dem Unterschied, dass bei 37°C. und niedriger Ionenstärke zuerst während 30 Minuten Synthese bis in das Plateau zugelassen wurde, und der Wiederstart durch Erhöhung der Ionenstärke auf HS aus dem Plateau erfolgte.
- e) Wie Ansatz b), mit dem Unterschied, dass CTP durch die Konzentration 0.01 mM limitierend für die RNA-Synthese im Ansatz war. Nach 20 Minuten Synthese bei 37°C. wurde die CTP-Konzentration auf 1mM unter gleichzeitiger Erhöhung der Ionenstärke auf HS gebracht (Nullwert).
- f) Wie Ansatz a), mit dem Unterschied, dass der Ansatz 60 Minuten lang vor Erhöhung der Ionenstärke auf HS inkubiert wurde. Nach dieser Zeit erst wurden die Aliquote entnommen.

In allen Ansätzen war für die Initiationskinetik-P32 ATP, für die Synthese H3 GTP nebst den anderen unmarkierten Nukleosidtriphosphaten anwesend.

Die Kinetik bei hoher Ionenstärke zeigt bezügl. der P32-Kettenanfänge einen Ablauf, der zwei verschiedene Steigungen erkennen lässt (Zeichnung b), eine initiale Steigung in den ersten zwei Minuten, die ungefähr einem angelegten P32-Kettenbeginn pro monomeren Enzymmolekül entspricht, und eine daran anschliessende geringere Steigung, die parallel zur Nettosynthese ist und auf Reinitiation zurückgeführt werden kann. Um auszuschliessen, dass die initiale Steigung in Zeichnung b) auf konsekutive Initiation durch mehrere, freie Enzymmoleküle

an einem Ort zurückzuführen ist, wurde das gleiche Experiment unter Heparin durchgeführt. Auch hier ist die erste Steigung zu sehen (Zeichnung c). Die gleiche Kinetik wie in Zeichnung b) ist in Zeichnung d) ebenfalls zu erkennen, nachdem im Niedrig-Salz-Plateau durch Zugabe von hohem Salz das Wiedereinsetzen der RNA-Synthese ausgelöst wurde. D.h., dass die bei niedriger Ionenstärke blockierten Enzymmoleküle sehr schnell re-initiieren. Sie verhalten sich nach Zugabe von hohem Salz identisch mit denen von Zeichnung b). Anders liegt der Fall, wenn limitierende Mengen CTP (vergleiche auch Abb.5) im Syntheseansatz vorliegen. Hier zeigt sich deutlich, dass nach Zugabe genügender Mengen CTP eine Phase eintritt, in der keine neuen Kettenanfänge erscheinen, jedoch RNA-Synthese erfolgt.

Der Heparin-stabile Zustand vor Zugabe von CTP ist tatsächlich ein Zustand, in dem die Enzymmoleküle, die RNA-Synthese begonnen haben, statistisch an der Matriz e arretiert sind und erst nach Anbieten ausreichender CTP-Mengen eine weitere Strecke der DNA transcribieren, ohne neue Kettenanfänge zu machen (Zeichnung e).

Die Kurven der Zeichnungen a) bis e) sind durch Messungen der RNA-Synthese an T5- und T4-DNA zustande gekommen, ähnliche Messungen wurden mit T7-DNA durchgeführt. Die entsprechenden Kurven zeigen gleichen Verlauf.

Anders allerdings liegt der Fall für T4-DNA (Zeichnung f). Der Wiederstart aus dem Niedrig-Salz-Plateau nach Zugabe von HS(s.Abk.) erfolgt nicht sprunghaft wie an T5- oder T7-DNA, sondern eher stetig. Hier werden nicht sofort neue Ketten angefangen. Aus den Verhältnissen der eingebauten Isotope bei diesen Doppelmarkierungs-Experimenten lassen sich in Uebereinstimmung mit anderen Autoren (44-46, 58) folgende Kettenlängen berechnen (Tabelle 1):

Tabelle 1: Kettenlängen (RNA) von T4-, T5- und T7-DNA

DNA	T4	T5	T7
"Hohe-Salz-RNA"	12 500	4000	7000
"Niedrig-Salz-RNA"	7 500	4000	7000

Die angegebenen Werte stellen Nukleotid-Reste dar.
(Durchschnittliche Kettenlänge pro RNA-Kette)

Für T5- und T7-DNA heisst dies, dass die Blockierung des Enzyms bei niedriger Ionenstärke am Ende einer Leseinheit eintritt, dem sogenannten Salz-Terminationsort.

Die unter beiden Salzbedingungen an T5- und T7-DNA synthetisierten RNA-Spezies sollten dann identisch sein.

Bei T4-DNA existieren innerhalb einer Leseinheit zwei nicht identische Orte, die entsprechend der Ionenstärke Kettenabbruch veranlassen.

Die Arretierung findet am Niedrig-Salz-Blockierungsort statt. Ein kleiner Anteil an Enzymmolekülen synthetisiert allerdings bis zum Hohen-Salz-Terminationsort, der Teil nämlich, der den kleinen Sprung bei Wiederstart mit hohem Salz (Zeichng.f) hervorruft.

Da unter Heparin aus dem Niedrig-Salz-Plateau der Wiederstart unmöglich ist, befinden sich die Mehrzahl der Enzymmoleküle an Orten, an denen sie Heparin-sensitiv sind, jedoch in Abwesenheit von Heparin nach Erhöhen der Ionenstärke Ketten verlängern, ohne neue Kettenanfänge zu erzeugen.

Nachdem die Kinetiken gezeigt haben, dass unter Niedrig-Salz-Bedingungen an definierten Orten Synthese-Abbruch erfolgt, gilt es, den Zustand des Syntheseblockes zu analysieren.

b. Analyse des blockierten Endzustandes der RNA-Synthese bei niedriger Ionenstärke.

Nachdem im letzten Kapitel die Modelle von Zeichnung a) und Zeichnung d) (Abbildung 2) ausgeschlossen werden konnten, bleibt die Frage, welches der verbleibenden zwei Modelle (Zeichnung b) oder Zeichnung c) für das Plateau der Niedrig-Salz-Kinetik zutrifft.

Diese Frage lässt sich durch Sedimentations- oder Filtrations-Experimente beantworten. Beide Methoden geben Auskunft, welche Komplexe zwischen DNA, Enzym und RNA im blockierten Zustand vorliegen.

Hierzu markiert man zweckmässig mit H^3 DNA mit P^{32} RNA und das Enzym mit C^{14} -oder S^{35} .

Die Filtrationsmethode:

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass RNA und native DNA Membranfilter aus Cellulosenitrat passieren, während Einzelstrang-DNA bis zu etwa 0.2 mg/cm^2 quantitativ auf solchen Filtern fixiert bleibt (47).

DNA-Enzymkomplexe haften ebenfalls auf diesen Filtern (48), sodass man annehmen muss, dass das Enzym diejenige Komponente ist, die quantitativ an Cellulosenitrat adsorbiert.

Dass dies der Fall ist, wurde mit S^{35} -markiertem Enzym gezeigt. Vollenzym, Minimalenzym wie auch sämtliche Untereinheiten des Enzyms werden quantitativ durch Membranfilter aus Cellulosenitrat (0.2 bis 3.0μ Porengrösse) und PVC (0.2 bis 0.6μ Porengrösse) zurückgehalten.

Die Bindung ist fest und nicht beeinflussbar durch Waschpuffer, bei denen die Temperatur, der pH oder die Salzkonzentration innerhalb vernünftiger Grenzen variiert wurden. (Tabelle 2)

Tabelle 2:

Filter	cpm/ μ g	E σ (34172)	E (31230)	β' (8522)	β (7743)	α (4132)	σ (3572)
--------	--------------	-----------------------	--------------	--------------------	-------------------	--------------------	--------------------

ϕ

a) Cellulosenitrat

0.2 μ	32119						
0.45 μ	33220						
0.8 μ	34350						
1.8 μ	32528						
3.0 μ	31110	30132	8219	7173	3922	3612	
8.0 μ	4320						

PVC

0.2 μ	34212						
0.4 μ	33927						
0.6 μ	33897	31270	8355	7642	4195	3487	

Celluloseacetat

0.2 μ	922	212	27	43	38	19	
-----------	-----	-----	----	----	----	----	--

b) 1. TMA:	10 ml	50 ml	100 ml	400 ml
E σ	34119	33210	34223	32413

2. Puffer(100ml)

TMA + 0.1 MKCl	+ 0.3 MKCl	+ 1 MKCl	+ 0.1 MEDTA	
E σ 33719	33287	34112	33932	

TMA + 0.1% Brij 35 (Detergenz)

E σ 92

3. TMA (100 ml)	t=0°C.	t=20°C	t=37°C.	pH 9.5	pH 8	pH 6.5
E σ	34217	33812	33592	33408	33927	34075

Filtrierbarkeit der RNA-Polymerase.

Je 1 μ g Protein in 4 ml TMA-Puffer wurde auf Filter des angegebenen Materials und der angegebenen Porengrösse gegeben und mit 50 ml TMA-Puffer gewaschen (a).

Je 1 μ g E σ wurde mit verschiedenen Pufferlösungen unter diversen Bedingungen auf Cellulosenitrat-Filtern (3.0 Porengrösse) gewaschen (b).

Die Durchlaufmenge Pufferlösung durch die Filter betrug in allen Experimenten ca. 25 ml/Minute. Die Werte sind in cpm aufgeführt. Werte in Klammern sind die entsprechenden TCA-Fällungen.

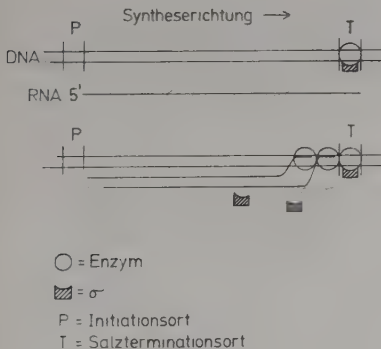
Dies bedeutet, dass alle Stoffe (DNA, RNA, Proteine), die am Enzym gebunden sind, unter gleichen Bedingungen ebenfalls an Membranfiltern fixiert werden.

Aus den Werten der Tabelle 3 lässt sich folgendes entnehmen:

1. Bei allen gewählten Enzym:DNA-Verhältnissen wird die DNA des Komplexes im Niedrig-Salz-Plateau auf dem Filter zurückgehalten, währenddem die RNA nur dann ebenfalls unfiltrierbar wird, wenn das Enzym:DNA-Verhältnis einen bestimmten Wert überschreitet. Hierfür ist folgendes Modell die Interpretation (Abbildung 8):

Abb.8:

Modell des Zustandes in der Niedrig-Salz-Termination im Falle von Äquivalenz von Enzymmolekülen: Promotoren einer bestimmten Menge DNA, und im Falle überschüssiger Mengen von Enzymmolekülen.



Ist die Menge Enzym an einer bestimmten Menge DNA bei nicht überlappenden Leseinheiten kleiner oder höchstens gleich der Anzahl Terminatoren, d.h. auch der der Promotoren, so findet bei niedriger Ionenstärke "korrekte" Termination statt, d.h., Enzymmoleküle initiieren, elongieren und terminieren an T5- oder T7-DNA, indem sie an Terminationsorten von Leseinheiten an der Matrice haften bleiben und die synthetisierten RNAs freisetzen.

Ist die Menge Enzym grösser als die Anzahl der Terminatoren= Promotoren, so findet konsekutive Initiation statt, und alle überschüssigen Enzymmoleküle laufen vor dem Terminationsort auf das "korrekt" terminierte Enzymmolekül auf, wobei sie die synthetisierte RNA nicht abgeben können.

Dieser Mechanismus eröffnet die Möglichkeit, Terminatoren zu zählen, oder bei bekannter Promotorenzahl unter irgendwelchen Bedingungen die Anzahl der Enzymmoleküle zu bestimmen, die an einem Promoter mit der Synthese begannen. Unter diesen Bedingungen und unter Annahme nicht überlappender Leseinheiten liefert die Rechnung für T5-DNA eine Promotorenzahl, die gegenüber der nach Bautz (49) bestimmten um mehr als die Hälfte reduziert ist.

2. Wäscht man das Membranfilter, das den Niedrig-Salz-Terminationskomplex (DNA-E) fixiert hat, mit Puffer hoher Ionenstärke, so wird die DNA nach einer bestimmten Kinetik freigesetzt, d.h. gewaschen.

Das Plateau bei niedriger Ionenstärke kommt also dadurch zustande, dass das Enzym fest am Terminationsort der Matrize gebunden bleibt. Nach Zugabe von HS wird es von diesem Ort freigesetzt und beginnt mit der Synthese neuer Ketten.

3 a) Filtriert man zu verschiedenen Zeiten einer Hohen-Salz-Kinetik Aliquote des Syntheseansatzes, so findet man zu allen Zeiten die gleiche Menge RNA auf dem Filter, nämlich den Anteil, der an den zu jedem Zeitpunkt an der Matrize synthetisierenden Enzymmolekülen haftet, während die bereits vollständig synthetisierten RNA-Ketten filtrierbar sind.

3 b) Im Falle des statistischen Arretierens von Enzym an der Matrize bei limitierenden Mengen CTP im Syntheseansatz bleibt die gesamte in Synthese begriffene RNA auf dem Filter.

4. Mit T4-DNA als Matrize findet man auch bei diesen Experimenten differente Verhältnisse:

Im Niedrig-Salz-Plateau wird die RNA auch im Ueberschuss von DNA bezügl. Enzym nicht freigesetzt, d.h, es findet an einem Ort der Leseinheit, der vor dem Hohen-Salz-Terminator liegt, eine Blockierung statt.

Die Kinetik des Anlegens neuer Kettenanfänge nach Wiederstart mit HS aus dem Niedrig-Salz-Plateau zeigt sehr schnelle Reinitiation, sodass mit der Filtertechnik (Tabelle 4) keine Kinetik des Abgehens von Enzym an der DNA gefunden wurde, jedoch ist das Ergebnis von Interesse, dass das Zerfallen des DNA-E-Komplexes nach der Termination bei niedriger Ionenstärke nicht Funktion der Magnesium-Konzentration, sondern allein Funktion der Ammonium-Ionen-Konzentration im Syntheseansatz ist.

Tabelle 3:

1.	$\mu\text{g E}\sigma$	H3-T5-DNA(25 g)	C14-E σ		P32-RNA	
	2.5	7399 (7924)	1141 (1140)		217 (6713)	
	5	7217 (7871)	2322 (2299)		7129(13642)	
	10	7123 (7932)	4517 (4487)		21512(27512)	
	Kontrollen:	H3-T5-DNA:	219 (7843)			
		C14-E σ	2297 (2122)			
2.	TMA+0.2 MKCl	20 ml	50 ml	100 ml	200 ml	
	H3-T5-DNA	(7931)	5219	3173	917	231
	C14-E σ	(1130)	1151	1103	1107	1097
3a. t=		10 min.	20 min.	30 min.	40 min.	50 min.
	P32-RNA	5332	5217	5481	5597	4982
		(7212)	(15379)	(21509)	(26431)	(43115)

3b. (3842) 3717 4.) (2512) 2374

Filtrierbarkeit von Synthesekomplexen:

H3-T5-Standardansätze mit steigenden Mengen C14-Enzym wurden bei niedriger Ionenstärke 60 Minuten bei 37°C. inkubiert (RNA-Markierung mit α -P32 ATP, 3 C/Mol) und entweder mit

100 ml eiskaltem TMA-Puffer filtriert oder mit TCA gefällt und filtriert (Werte in Klammern).

Bei den Kontrollen wurden 25µg H3-T5-DNA und 5 µg C14-Enzym einzeln mit TMA filtriert oder TCA gefällt und filtriert (1).

T5-NS-Standardansätze, jedoch mit 2.5 µg C14-Enzym und 25 µg H3-T5-DNA und nicht markierten Triphosphaten wurden 60 Min. bei 37°C. inkubiert. Anschliessend wurden die Ansätze filtriert und mit verschiedenen Mengen Puffer, der hohe Ionenstärke enthielt, gewaschen. Die Werte in Klammern stellen die entsprechenden TCA-Fällungen dar (2).

Ein vierfacher HS-T5-Standardansatz wurde diverse Zeiten bei 37°C. inkubiert. Jeweils 0.1 ml Aliquote wurden entnommen, filtriert und mit 100 ml TMA gewaschen. Die Werte in Klammern sind die entsprechenden Referenzen, die TCA gefällt und filtriert wurden (3a).

Zwei NS-T5-Standardansätze mit limitierenden Mengen CTP (0.02 mM) im Inkubationsansatz wurden 40 Minuten bei 37°C. inkubiert und wie (3a) zum Zählen präpariert (3b).

Zwei NS-T4-Standardansätze wurden 60 Minuten bei 37°C. inkubiert und wie 3a) zum Zählen präpariert (4).

Die RNA in den Ansätzen 3) und 4) wurde mit α -P32 ATP, 3C/M markiert. Alle angegebenen Werte sind cpm.

Tabelle 4:

1. Min.	0°C.	27°C.	37°C.
1	468	503	488
5	465	501	467
10	476	473	462

2. Tris·HCl (0.03 M, pH 7.9)	+0.03 MMg ²⁺	+0.07 MMg ²⁺	
7471	7513	7486	

+0.05 MNH ₄ ⁺	+0.1 MNH ₄ ⁺	+0.2 MNH ₄ ⁺	
7217	1530	207	

Einfluss der Temperatur und der Ionenstärke auf die E-DNA-Wechselwirkung des terminierten Niedrig-Salz-Komplexes.

NS-T5-Standardansätze (H3-T5-DNA, die Triphosphate waren nicht markiert) wurden 60 Minuten bei 37°C. inkubiert,

in 4 ml TNA + 0.2 MKCl verschiedener Temperatur aufgenommen und nach diversen Zeiten filtriert. Die Menge der markierten DNA in jedem Ansatz betrug 25 μ g = 7490 cpm (1).

Ansätze wie 1), jedoch wurden diese Synthesekomplexe mit jeweils 200 ml Puffer, der verschiedene Ionenstärken enthielt, filtriert (2).

Die Werte sind in cpm angegeben.

Sedimentationsanalyse der nach Erreichen des Plateaus der Kinetik der RNA-Synthese bei niedriger Ionenstärke vorliegenden Komplexe.

Sucrosegradienten von Niedrig-Salz-Synthesekomplexen mit DNA aus den Bakteriophagen T5 und T7 als Matrize bestätigen die Filtrationsexperimente, Abb.9.

Man erkennt, dass bei niedriger Ionenstärke (Zeichng.a,c) DNA und Enzym cosedimentieren, währenddem bei hoher Ionenstärke das Enzym unabhängig sedimentiert, also freigesetzt ist (Zeichng.b,d).

In Zeichnung a) ist allerdings zu sehen, dass ein beträchtlicher Teil des C14-Enzyms auch bei niedriger Ionenstärke nicht mit der DNA cosedimentiert. Dieser Anteil ist enzymologisch inaktives Enzym, das durch Isotopenzerfall entstanden ist.

Bei allen beschriebenen Experimenten muss sicher gestellt werden, dass keine RNAase in den Syntheseansätzen vorhanden ist. Dies wurde kontrolliert, indem P32-M12 RNA 30 Minuten bei 37°C. mit allen im Syntheseansatz befindlichen Komponenten inkubiert und anschliessend durch Sedimentation im Sucrosegradienten auf seine Intaktheit geprüft wurde, Abb.10.

Abb. 9a)

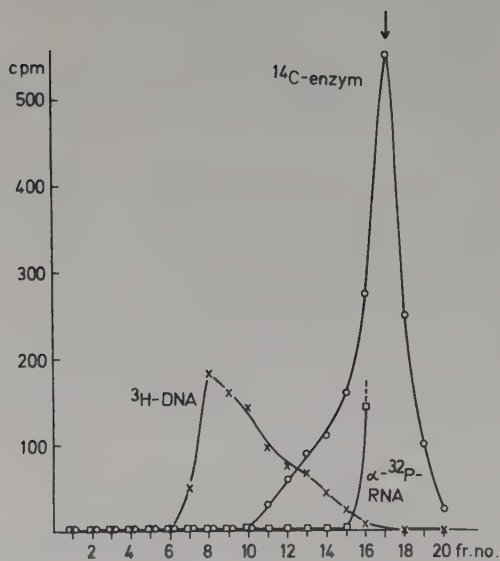


Abb. 9b)

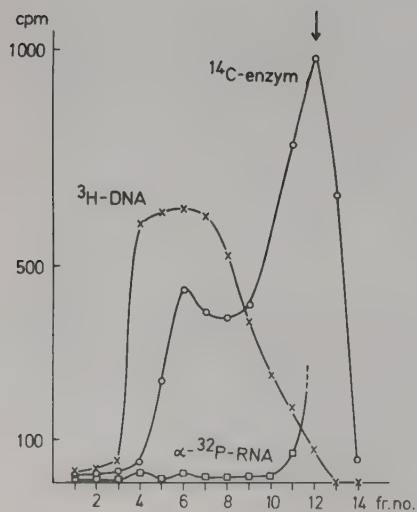


Abb. 9c)

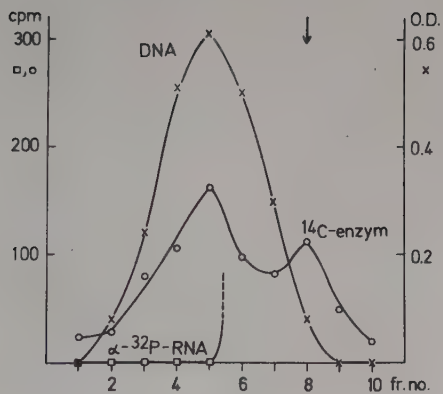


Abb. 9d)

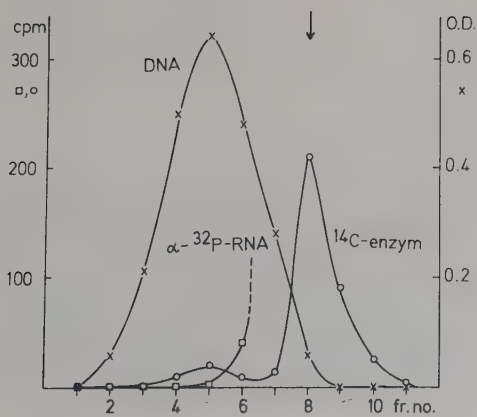


Abb.9: Sedimentationsanalyse der nach Erreichen des Plateaus der Kinetik der RNA-Synthese bei niedriger Ionenstärke vorliegenden Komplexe.

NS-T5- und NS-T7-Standardansätze wurden 45 Minuten bei 37°C. inkubiert. Das Enzym war C14-, die T5-DNA H3- und die RNA α -P32-markiert. Die Ansätze wurden danach in NS-(9a=T5-DNA, 9c=T7-DNA) und HS- (9b=T5-DNA, 9d=T7-DNA)- Sucrosegradienten bei 40°C., 50 000 Upm im SW.50.1-Rotor 4 Stunden für T7-DNA, 56 000 Upm im SW.56.1-Rotor 90 Minuten für T5-DNA, sedimentiert. (Fraktion 1=Boden des Gradienten)

Die Pfeile in den Zeichnungen bedeuten die zurückgelegte Strecke von Enzym in Referenz-Sedimentationsläufen.

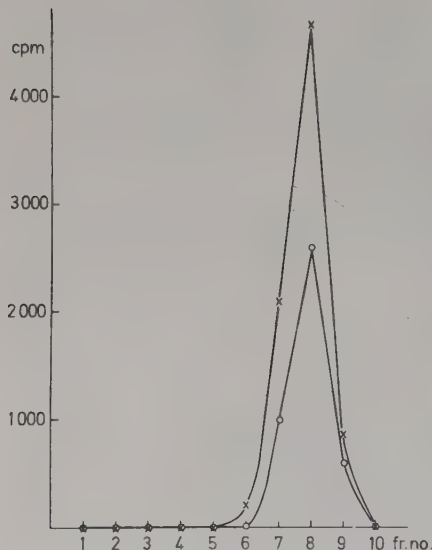


Abb.10:

Test des Transcriptions-
systems auf RNAase-Akti-
vität.

0.1 ml P32-markierte M12-RNA wurde 600 Min. bei 37° C. in einem NS-T5-Standardansatz (ohne markierte Triphosphate) inkubiert. Der ganze Ansatz (0.25 ml) wurde 90 Min. in einem HS-Sucrosegradienten bei 40°C. und 56 000 Upm im SW.56.1-Rotor in einer Beckman - Präparativen-Ultrazentrifuge sedimentiert. (Fraktion 1=Boden des Gradienten)

Eine weitere wichtige Frage ist der Verbleib des Initiationsfaktors σ im Niedrig-Salz-Plateau (50).

Ergänzt man einen Syntheseansatz bei niedriger Ionenstärke nach Erreichen des Plateaus mit Minimal-Enzym, um festzustellen ob σ noch verfügbar ist, so findet man nur den niedrigen Einbau der entsprechenden Menge Minimal-Enzym.

Der die Synthese stark stimulierende, katalytisch wirkende Initiationsfaktor σ ist für das Minimal-Enzym im Plateau bei niedriger Ionenstärke nicht verfügbar, Tabelle 5.

Tabelle 5:

1a) Standardansatz	5604
b) + 5 μ g PC-Enzym	5860
c) +25 μ g SS-T5-DNA	5632
2a) Standardansatz (mit PC-Enzym)	257
b) + 5 μ g σ	5203

Test auf freies σ und freies Minimalenzym im bei niedriger Ionenstärke terminierten Komplex.

NS-T5-Standardansätze wurden bei 37°C. 60 Minuten inkubiert (1a). Nach dieser Zeit wurde in Parallelansätzen entweder Minimal-Enzym (Test auf freies σ im terminierten Komplex) oder SS-T5-DNA (Test auf freies Minimal-Enzym im terminierten Komplex) nach 60 Minuten Inkubation zu den Ansätzen dazugegeben und weitere 40 Minuten inkubiert (1 b, 1 c). NS-T5-Standardansätze, nur mit Minimal-Enzym (2a), und mit σ (2b), sind Kontrollansätze. Die Werte sind $\overline{cpm}$ der TCA-Fällungen. Die Markierung erfolgte durch C14-ATP, 0.3 C/M.

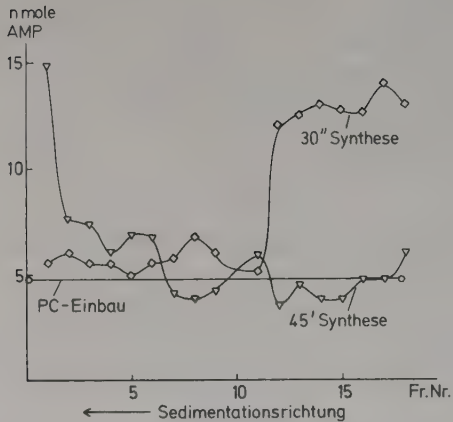
Um zu erfahren, ob σ im Niedrig-Salz-Plateau inaktiviert oder festgebunden vorliegt, wurde je ein Syntheseansatz nach 30 Sekunden Inkubationszeit bei 37°C. und nach 45 Minuten Inkubationszeit bei niedriger Ionenstärke, also im Plateau, auf einen Sucrosegradienten geschichtet und dergestalt sedimentiert, dass der Enzym-DNA-Komplex sich kurz über dem Boden des Zentrifugenröhrchens befand.

Die fraktionierten Aliquote wurden in Syntheseansätzen mit Minimal-Enzym bei hoher Ionenstärke auf σ -Stimulierung getestet, Abb.11.

Abb.11: σ -Verbleib während der Synthese bei niedriger Ionenstärke.

Zwei zwanzigfache NS-T5-Standardansätze wurden entweder 30 Sekunden oder 45 Minuten bei 37°C. inkubiert, anschliessend auf einen NS-Sucrosegradienten geschichtet und bei 4°C. und 27 000 Upm 20 Stunden im SW.27-Rotor von Beckman sedimentiert. Die Fraktionen wurden auf σ -Gehalt mittels HS-T5-Standardansätzen (10 Min. Synthese bei 37°C.), die Minimal-Enzym enthielten, getestet. (Fraktion 1 = Boden des Gradienten).

Abb.11:



σ wird nach 30 Sekunden Synthese kurz unterhalb des Meniskus des Sucrosegradienten gefunden, während es im Niedrig-Salz-Plateau mit dem Enzym-DNA-Komplex cosedimentiert, d.h., nach 30 Sekunden Synthese ist σ aus dem Synthesekomplex freigesetzt, während es nach 45 Minuten wieder am terminierten Enzym an der DNA gebunden zu sein scheint. (siehe Abb.8)

Das Freisetzen von σ nach Synthesebeginn erfolgt zwar schnell, wird aber limitierend bei Sättigungsversuchen von Enzym und DNA. Dies konnte aus Experimenten erkannt werden, bei denen mit σ -gesättigtem Enzym bis zu 20 Enzymmoleküle pro Leseinheit an T5-DNA lineare RNA-Synthese zeigten. Die Sättigung mit Enzym, das nur ca. 30% σ enthält, zeigte schon eine Sättigung bei 10 Molekülen pro Leseinheit.

Das Freiwerden der RNA im Niedrig-Salz-Plateau hat nichts mit dem prozentualen Anteil von Faktor σ bezügl. Enzym zu tun. (Tabelle 6)

Tabelle 6:

	TMA	TCA
E + 5% σ	28	2967
E + σ Sättigung	42	5230

Einfluss des σ -Gehaltes bezügl. Enzym auf die Termination.

NS-T5-Standardansätze mit Ausnahme, dass für die "korrekte" Termination nur 2.5 μ g Enzym mit verschiedenem σ -Gehalt mit 25 μ g T5-DNA 60 Minuten bei 37°C. inkubiert wurden, wurden einerseits mit 100 ml eiskaltem TMA-Puffer filtriert, andererseits TCA-gefällt und filtriert. Die Angaben sind cpm. Die Markierung der RNA erfolgte durch C14 ATP, 0.3 C/M.

Wenn Faktor σ nicht an das Enzym gebunden ist, erweist er sich als stark thermolabil. Man könnte einerseits das Binden von σ an das Enzym im Plateau-Komplex als natürlichen Schutzmechanismus betrachten, andererseits ist diese Bindung derart stark, dass man den Zustand vielleicht als Vorbereitung für die nächste Initiation interpretieren muss, ein bei niedriger Ionenstärke stationärer Zustand, der bei hoher Ionenstärke schnell durchschritten wird.

- c) Analyse der an T4-, T5- und T7-DNA bei niedriger und hoher Ionenstärke synthetisierten RNA-Spezies.

Unter den vielen Methoden zur Charakterisierung von RNA-Spezies wurden die Hybridisierungskompetition (47) und die Methode der Elektrophorese in logarithmischen Polyacrylamid-Gelen angewandt (51).

In Uebereinstimmung mit den Resultaten der Kettenlängenbestimmungen durch γ -P32-Markierung findet man bei T4-DNA RNA-Spezies, die nur bei hoher Ionenstärke transkribiert und neben den Sequenzen der Niedrig-Salz-Spezies zusätzliche Sequenzen enthalten (52).

Bei T5- und T7-DNA sind die bei niedriger und hoher Ionenstärke synthetisierten RNA-Spezies identisch, Abb.13 und 12.

Die Elektrophorese in logarithmischen Gelen lässt für T7-DNA vier RNA-Spezies erkennen, die sowohl bei hoher und als auch bei niedriger Ionenstärke synthetisiert werden, für T5-DNA sowohl nach Synthese bei hoher als auch bei niedriger Ionenstärke einen breiten Gipfel, unter dem vermutlich viele Spezies kaum verschiedener Kettenlänge vorhanden sind, und für T4-DNA bei niedriger Ionenstärke drei Spezies, bei hoher vier Spezies, wobei die zweitleichteste bei niedriger Ionenstärke synthetisierte RNA mit der leichtesten bei hoher Ionenstärke synthetisierten RNA identisch zu sein scheint, Abb.14.

Erstaunlich ist die Tatsache, dass an T7-DNA mehr als eine RNA-Spezies synthetisiert wird. In einer früheren Arbeit (44) wurde gezeigt, dass von T7-DNA eine definierte RNA, Molekulargewicht 2.2 Mio., transkribiert wird. Da die Syntheseansätze zur Isolierung genügender Mengen RNA Enzym im grossen Ueberschuss bezügl. Promotoren enthalten, ist es möglich, dass drei weitere, schwächere Promotoren erschlossen werden (49).

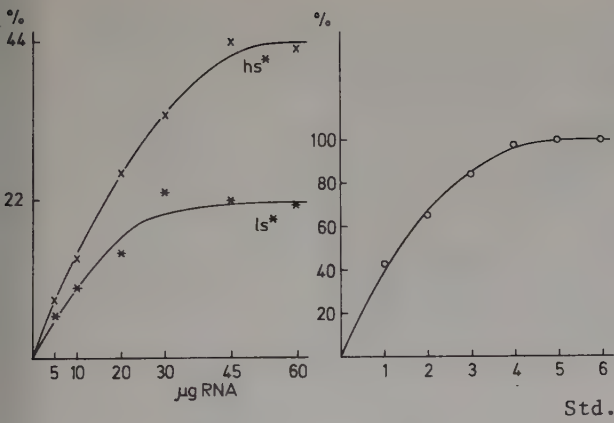


Abb. 12a)

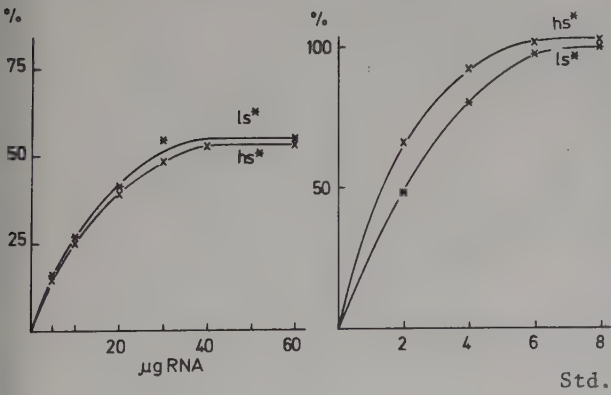


Abb. 12b)

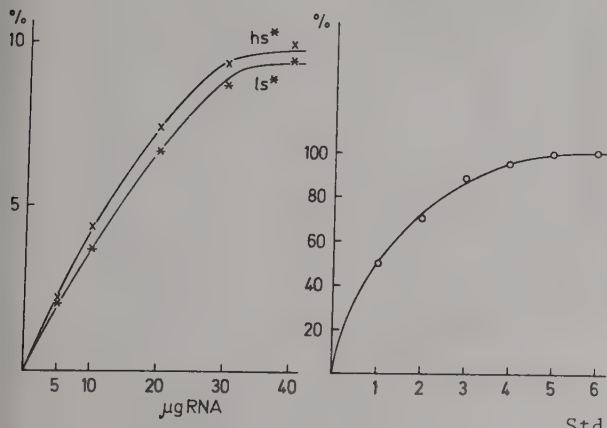


Abb. 12c)

Abb. 13a)

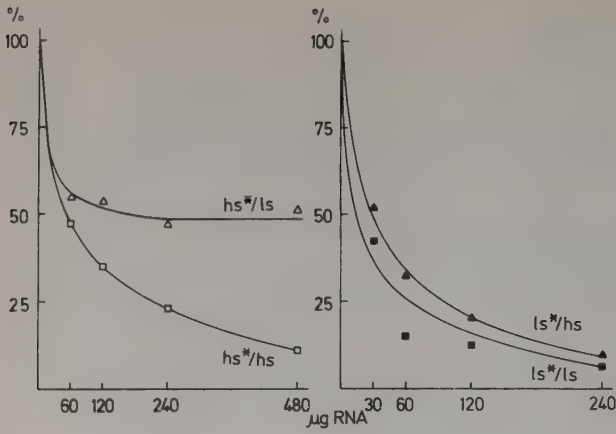


Abb. 13b)

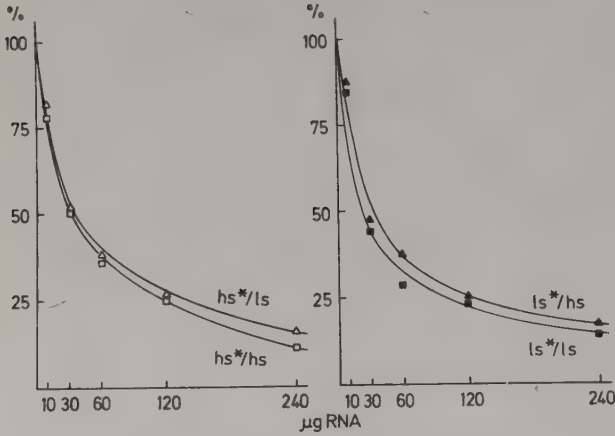


Abb. 13c)

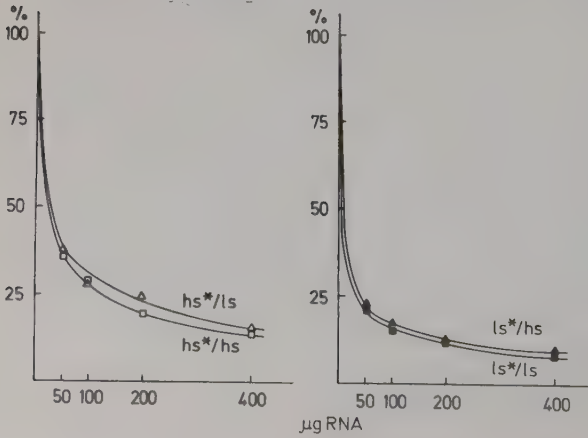


Abb.12 und 13: Analyse der an T4-, T5- und T7-DNA bei niedriger und hoher Ionenstärke synthetisierten RNA-Spezies durch Hybridisierung und kompetitive Hybridisierung.

Sättigungskurven, Hybridisierungskinetiken und Hybridisierungskompetitionen. Die mit * bezeichneten Salze sind C14-markierte RNA-Spezies der entsprechenden Ionenstärke im Synthesansatz.

1s* = C14-markiertes Transcript, synthetisiert bei niedriger Ionenstärke.

hs* = C14-markiertes Transcript, synthetisiert bei hoher Ionenstärke.

1s,hs: unmarkierte Transkripte, synthetisiert bei niedriger, resp. hoher Ionenstärke.

a) = T4-Transkripte

b) = T5-Transkripte

c) = T7-Transkripte

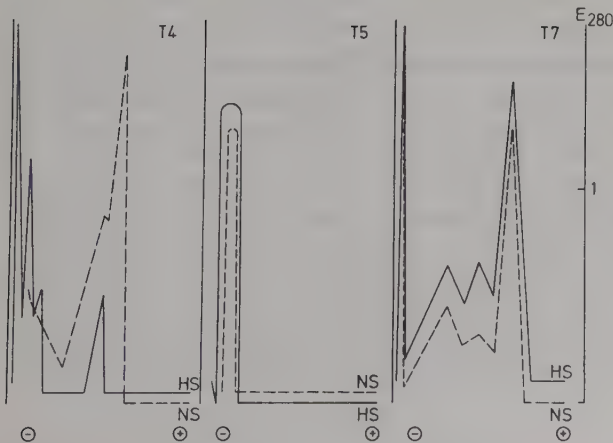
Abb.12: Hybridisierungs-Sättigungskurven und Hybridisierungs-Kinetiken

Abb.13: Hybridisierungs-Kompetitionen

Abb.14:

Identität der NS- und HS-Transkripte verschiedener Matrizen.

Logarithmische Acrylamid-Gelelektrophorese (0.9-5% Acrylamid) von NS- und HS-T4-, T5- und T7-Standardansätzen.



Die Synthese einer einzigen m-RNA-Kette pro Enzym und Leseinheit bei niedriger Ionenstärke und mehrerer identischer Ketten bei hoher Ionenstärke in vitro kann als mögliches Regulationsprinzip in vivo betrachtet werden. Da bei Prokaryonten aber keine Kompartimentierung in der Zelle vorhanden ist, müsste eine der zwei extremen Ionenstärken, vielleicht die hohe, durch Faktoren gemimt werden, da z.B. das Translationssystem in vitro bei niedriger Ionenstärke optimal arbeitet (62).

Die Transcription bei niedriger Ionenstärke käme für eine Zelle im Ruhestand in Betracht (kleine Proteinbiosynthese), bei durch Faktoren gemimter hoher Ionenstärke für Phasen grosser Zellaktivität, z.B. bei der Teilung.

Schwieriger zu interpretieren ist bei T4-DNA die Tatsache, dass je nach Salzbedingungen zwei verschiedene Orte für Kettenabbruch existieren. Als allgemeines Regulationsprinzip in der Zelle ist auch dies akzeptabel, allerdings fragt man sich bei T4-DNA nach dem Sinn des zusätzlichen zweiten, früheren Blockierungsortes.

Bei der T4-Infektion von E.coli wird das Enzym grösstenteils chemisch verändert (55,56,57), die Transcription der frühen T4-Gene wird also nicht durch Normalenzym vollzogen.

Ausserdem bleibt bei niedriger Ionenstärke die RNA am Enzym gebunden, was für die katalytische Synthese in vivo Ablösemeechanismen (Faktoren, z.B.Nukleasen) erfordern würde.

Auskunft über die Bedeutung der Niedrig-Salz-RNA bekäme man evtl. durch Vergleich der RNA-Spezies, die durch normales, alteriertes und modifiziertes Enzym an T4-DNA transcribiert werden, oder wenn man mit Hilfe des Proteinbiosynthesesystems das Spektrum der an Hoch- und Niedrig-

Salz-RNA synthetisierten Proteine charakterisieren würde.

So könnte man vielleicht dem zweiten Salzblockierungsort funktionelle Aufgaben zuteilen.

Dass man in der Literatur bis heute lesen kann (41, 53, 54), dass bei niedriger Ionenstärke ein Komplex aus DNA, Enzym und RNA vorliegt, liegt daran, dass meist ein grosser Ueberschuss von Enzym bezügl. Promotoren eingesetzt wurde, so dass infolge des Auflaufens überschüssiger Enzymmoleküle auf jenes, das korrekt terminiert hat, die von diesen synthetisierte RNA nicht freigesetzt wird.

Die Tatsache, dass bei niedriger Ionenstärke Enzym an der Matrize fixiert bleibt, ermöglicht die Isolierung dieses Terminators, in der Hoffnung, die Sequenzanalyse könnte Aufschluss darüber geben, wie diese Terminations-signale durch das Enzym erkannt werden.

Die dimere Form der Polymerase und die ins Plateau führende RNA-Synthesecharakteristik bei niedrigerer Ionenstärke stehennicht im unmittelbaren Zusammenhang. Bei einer Ionenstärke von 0.2 liegt das Enzym bereits in monomerer Form vor, wohingegen die optimale RNA-Synthese erst bei einer Ionenstärke von 0.37 eintritt.

Aus der Anzahl synthetisierter RNA-Ketten und der Menge Enzym im Syntheseansatz lässt sich errechnen, dass die monomere Form auch bei niedriger Ionenstärke die aktive ist. (siehe auch Kapitel II,2).

Die Frage, welche Funktion der Dimerisierung bei niedriger Ionenstärke zuzuordnen ist, bleibt also offen.

2. Die Blockierung der Transcription durch Faktoren (Proteine).

Die Präsenz eines weiteren, vom Salzterminationsort verschiedenen Ortes an dem Blockierung der RNA-Synthese erfolgt, ist mit der Entdeckung des Faktors ρ (24) offensichtlich geworden.

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde ein weiterer, neuer Faktor (κ) isoliert, der in seiner Wirkungsweise dem Faktor ρ ähnelt.

Die Mechanismen dieser Blockierungsprozesse werden in den folgenden Kapiteln untersucht.

a) Terminationsfaktor ρ

In Gegenwart von ρ werden kürzere RNA-Ketten von den gleichen Initiationsorten her synthetisiert (24, 59), d.h., Faktor ρ führt zu Kettenabbruch an Orten, die zwischen Initiator und Salzterminator liegen.

Faktor ρ ist an den Matrizen λ -, T4- und T7-DNA nur bei niedriger Ionenstärke im Syntheseansatz aktiv (24,59).

Der Faktor scheint ein echter Transcriptionsfaktor zu sein, da mit ρ und Enzym an T4-DNA nur die unmittelbaren frühen Gene, ohne ρ alle frühen Gene transkribiert werden (60).

Diep-Termination soll dadurch zustandekommen, dass je eine bestimmte Menge ρ an Enzym und an DNA gebunden wird, nämlich 5 ± 1 monomere ρ -Partikel an das Enzym und $2 \mu\text{g}$ ρ an $2 \mu\text{g}$ T7-DNA in der Sättigung (61).

Die nachfolgenden Experimente wurden zur Charakterisierung der Blockierung in Gegenwart von ρ angestellt.

Die Anwendung sättigender Mengen ρ (Abb.15) in Syntheseansätzen mit T4-, T5- und T7-DNA (Tabelle 7) bestätigt die Werte von Goldberg (59). (Nur bei niedriger Ionenstärke erzeugt ρ eine Depression in der RNA-Synthese.)

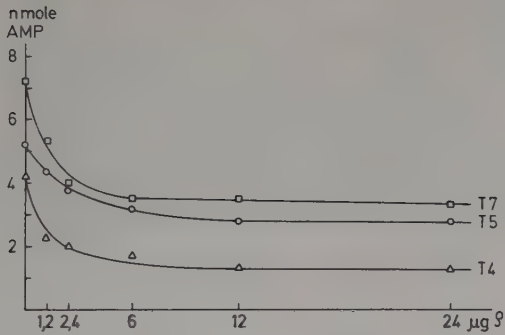


Abb.15: ρ -Sättigungskurven an verschiedenen Matrizen.

NS-T4-, T5- und T7-Standardansätze wurden mit steigenden Mengen ρ 30 Minuten bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt und filtriert.

Tabelle 7:

	T4	T4+ ρ	T5	T5+ ρ	T7	T7+ ρ
NS	623	172	1213	622	1438	789
MS	1139	1149	2400	2170	2693	2728
HS	1670	1689	3119	2956	2777	2902

	E.alt.		E.mod.+ σ	
	NS	HS	NS	HS
T4	4983	9070	1987	3991
T4+ ρ	1376	1338	394	403

Tabelle 7: ρ -Aktivität in Abhängigkeit von der Ionenstärke, getestet mit normal-, alteriertem- und modifiziertem-Enzym.

Die drei verschiedenen Enzyme wurden mit und ohne sättigenden Mengen ρ bei niedriger und hoher Ionenstärke in T4-, T5- und T7-Standardansätzen getestet. Das modifizierte Enzym wurde dazu zusätzlich mit sättigenden Mengen des Initiationsfaktors σ versehen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C. Nach 60 Minuten wurden die Ansätze TCA gefällt, filtriert und gezählt. Die Markierung erfolgte mit Cl4 ATP, 0.1 C/M. Die Werte sind in cpm angegeben.

Zusätzlich ist für T4-DNA ersichtlich, dass unter Verwendung von alteriertem und modifiziertem Enzym auch bei hoher Ionenstärke Depression erfolgt.

Dies ist ein weiterer Hinweis, dass ρ , abgesehen von seiner Bindung an die Matrize, die bei 0°C. und auch bei 20°C. nur bei niedriger Ionenstärke stattfindet (Tabelle 8), auch an das Enzym bindet.

Tabelle 8:

a) ρ -DNA-Bindung			b) ρ -und SS-DNA	
	0°C.	20°C.	- ρ	+ ρ
NS	26902	25238	1821	1962
MS	154	193		
HS	215	97		

c) ρ in der Präinkubation			
DNA	Enzym	DNA+Enzym	DNA+Enzym + ATP,UTP,GTP
- ρ 6215	5992	6490	6403
+ ρ 1503	1466	1648	1647

Bindung von ρ an die Matrize und ρ -Aktivität an SS-DNA und in der Präinkubation.

10 μ g H3-T5-DNA (27103 cpm) wurden mit einem 1 μ g ρ bei 0°C. und 20°C. bei diversen Ionenstärken inkubiert und mit

100 ml Puffer bei der gleichen Temperatur und Ionenstärke filtriert und gezählt (a).

NS-T4-Standardansätze, mit Ausnahme, dass anstelle nativer DNA Einstrang-DNA verwendet wurde, inkubierte mit sättigenden Mengen ρ 60 Minuten bei 37°C., anschliessend wurden die Ansätze TCA gefällt, filtriert und gezählt (b).

ρ wurde mit den entsprechenden Stoffen, die über den Zahlen in der Tabelle aufgeführt sind, in einem NS-T4-Syntheseansatz 10 Minuten bei 37°C. präinkubiert, dann mit den fehlenden Stoffen zwecks Synthese über 60 Minuten komplettiert und wie b) weiterinkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt (c).

Die Markierung erfolgte durch C14 ATP, 1 C/M. Die Werte sind in cpm angegeben.

Unter diesen Bedingungen erwartet man verschieden hohe Sättigungsmengen von ρ , wenn in einem Standardansatz entweder die DNA-Menge oder die Enzym-Menge variiert wird, was Abb.16 andeutet.

Abb.16:

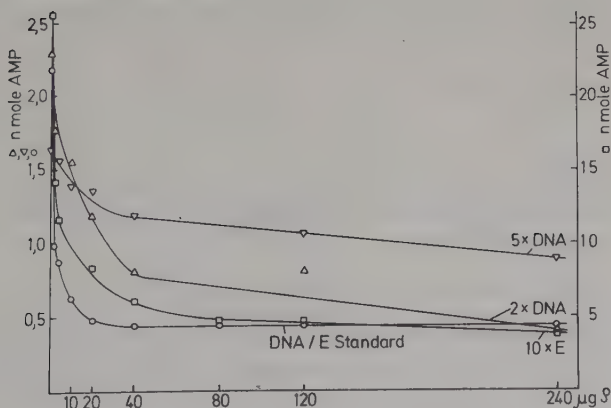


Abb.16: Abhängigkeit der ρ -Sättigung von der Menge DNA und Enzym im Syntheseansatz.

NS-T4-Standardansätze, Ansätze mit der doppelten und fünffachen Menge DNA, Ansätze mit der zehnfachen Menge Enzym bezügl. Standardansatz wurden 30 Minuten bei 37°C. mit steigenden Mengen ρ inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Man sieht ausserdem in Tabelle 8, dass ρ bei niedriger Ionenstärke an nativer DNA, nicht aber an SS-DNA aktiv ist.

Die niedrige Ionenstärke im üblichen Syntheseansatz wird zur Hauptsache durch zwei verschieden geladene Ionen repräsentiert, Mg-Ionen und Ammoniumionen.

Man kann sich nun fragen, ob die totale Ionenstärke oder nur eine bestimmte Konzentration eines der beiden Ionen für die ρ -Hemmung essentiell ist.

Abb.17 zeigt eindeutig, dass die Hemmung nur unterhalb einer bestimmten Mg-Konzentration, nämlich kleiner als 0.01 M., eintritt. Die grösste relative Hemmung sieht man nur in Anwesenheit relativ hoher Ammoniumionen-Konzentration.

Die ρ -Hemmung ist also nicht Ionenstärke-abhängig, sondern tritt spezifisch unterhalb von bestimmten Mg-Ionen-Konzentrationen ein.

Die Depression der RNA-Synthese kann folgende drei Gründe haben:

1. Mit Faktor ρ tritt an Orten der Matrize, die vor den Salzterminationsorten liegen, eine absolute Blockierung der RNA-Synthese ein.
2. Mit Faktor ρ werden zwar dieselben Spezies wie bei niedriger oder hoher Ionenstärke transkribiert, jedoch ist die durchschnittliche Kettenlänge wesentlich geringer unter der Wirkung des Faktors ρ . Faktor ρ wäre in diesem Fall ein "Schneidefaktor".

3. Mit Faktor ρ findet an Orten eine Termination statt, die zwischen den Initiationsorten und den Salzterminationsorten liegen. Es würden in diesem Fall viele identische, aber kürzere Kopien als bei niedriger oder hoher Ionenstärke synthetisiert. ρ wäre in diesem Fall ein katalytisch wirkender Faktor.

Um zu entscheiden, welche der drei aufgeführten Möglichkeiten zutrifft, wurden Kinetiken der RNA-Synthese aufgezeichnet.

Im Falle von T4 zeigt die Kinetik (Abb.18), dass in Gegenwart von ρ bei niedriger Ionenstärke ein definiertes, tieferes Plateau eintritt.

Faktor ρ ist also ein Blockierungsfaktor. (These 1).

Da die initiale Steigung in Gegenwart von ρ geringer ist als die der Kontrollkurve, wird der schon erwähnte Befund bekräftigt, dass Faktor ρ während der Synthese auch an das Enzym bindet, sodass die Syntheserate durch diese Interaktion erniedrigt wird.

Abb.17:

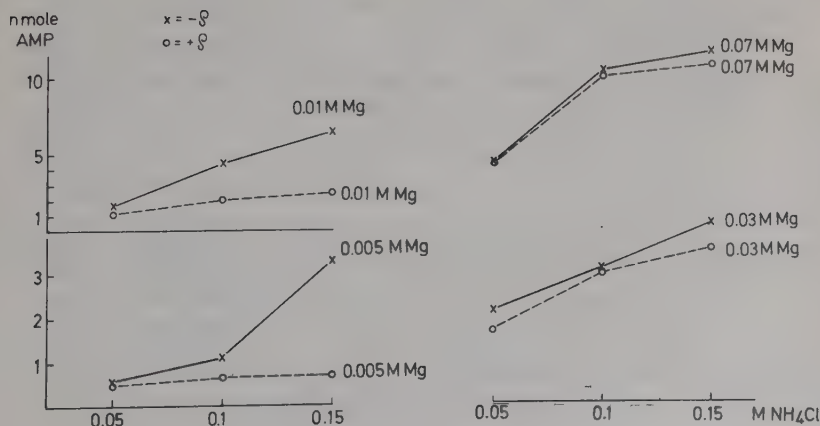
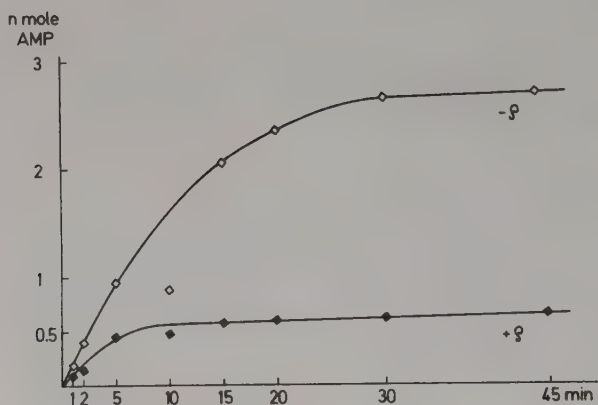


Abb.17: Abhängigkeit der ρ -Hemmung von den Ionen: Mg^{2+} und NH_4^+ .

NS-T4-Standardansätze wurden unter verschiedenen Salzbedingungen 30 Minuten bei $37^\circ C$. mit ρ (gestrichelte Linien) und ohne ρ (durchgezogene Linien) inkubiert. Die Ansätze wurden TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Abb.18:



Synthese-Kinetik bei niedriger Ionenstärke mit Faktor ρ .

Zwei zehnfache NS-T4-Standardansätze, wobei der eine sättigende Mengen ρ enthielt, wurden bei $37^\circ C$. inkubiert. 0.25 ml Aliquote wurden nach verschiedenen Zeiten entnommen, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

In Übereinstimmung mit den RNA-Kinetiken ist der Tabelle 9 zu entnehmen, dass unter Beibehaltung aller Kettenanfänge nur bei niedriger Ionenstärke eine eindeutige Kettenverkürzung eintritt, nämlich im Durchschnitt an T4-DNA 1250 Nukleotidreste pro Kette in Anwesenheit des Faktors ρ , gegenüber 7500 Nukleotidreste pro Kette ohne Faktor. Die Kettenverkürzung der T5- und T7-Transcripte beträgt ca. 50%.

Tabelle 9:

	γ -P32 pppA	H3-GMP	Kettenlänge (Nukleotidreste)
NS	5100	3544	$\approx$ 7000
NS+ ρ	5238	2223	$\approx$ 4400
HS	15223	11209	$\approx$ 7000
HS+ ρ	16512	11783	$\approx$ 7000
T4-DNA		- ρ	$\approx$ 7500
		+ ρ	$\approx$ 1250

Kettenlängen mit und ohne Faktor ρ an T7-DNA synthetisierter RNA bei verschiedenen Ionenstärken, und Kettenlängen der T4-Transcripte mit und ohne Faktor ρ .

NS- und HS-T7-Standardansätze und NS-T4-Standardansätze wurden mit oder ohne sättigenden Mengen ρ 60 Minuten bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt. Die Werte für T7-DNA sind zugleich in cpm angegeben. Die Markierung war -P32 ATP (1000 C/M) und H3-GTP (5 C/M).

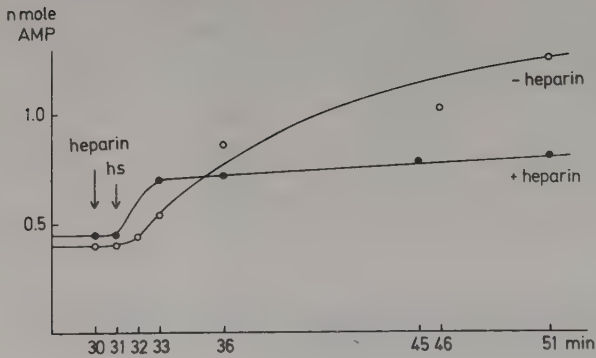
Nachdem gezeigt wurde, dass die ρ -Wirkung zu einem blockierten Endzustand der RNA-Synthese führt, an Orten, die in der "mittleren Leseinheit" vor den Salzterminationsorten liegen, muss als nächstes dieser Zustand charakterisiert werden.

Hebt man diesen Zustand, der nur bei niedriger Ionenstärke eintritt, mit hohem Salz in Anwesenheit von Heparin auf, so erhält man eine weitere RNA-Synthesestufe bis zu einem nach kurzer Zeit erreichten höheren Plateau, das mit dem in Abwesenheit von ρ erreichten Niedrig-Salz-Plateau übereinstimmt. (Abb.19)

Abb.19: Aufhebung des ρ -blockierten Zustandes durch Erhöhung der Ionenstärke und gleichzeitiger Zugabe von Heparin.

Zwei zehnfache NS-T5-Standardansätze werden mit und ohne Faktor ρ 30 Minuten bei 37°C. inkubiert. In der dreissigsten Minute wurde in einen Ansatz 500 μ g Heparin, in der einunddreissigsten Minute hohes Salz in beide Ansätze gegeben. 0.25 ml Aliquote wurden zu verschiedenen Zeiten entnommen, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Abb.19



Der Wiederstart aus dem ρ -Plateau ist also nicht Heparin-sensitiv. Dies lässt vermuten, dass Enzym, ρ , DNA und RNA in einem festen Komplex vorliegen, der dem "aktiven Komplex" während der Elongation entspricht. Das nach Wiederstart in Anwesenheit von Heparin erreichte Plateau ist darauf zurückzuführen, dass das Enzym vom ρ -Ort aus die Synthese bis zum Salzterminationsort weiterführt und dort durch Ablösung (bei hoher Ionenstärke!) Heparin-sensitiv wird (38).

Sofort stellt man die Frage, ob nach diesem Wiederstart neue γ -P32 Anfänge synthetisiert werden. Dies ist nicht der Fall (Abb.20).

Abb.20: Aufhebung des ρ -blockierten Zustandes durch hohe Ionenstärke.

Ein fünffacher NS-T4-Standardansatz, mit der doppelten Menge Enzym (γ -P32 ATP und H3-GTP-markiert), wird mit sättigenden Mengen ρ 30 Minuten bei 37°C. inkubiert. Nach Zugabe von hohem Salz werden 0.25 ml Aliquote nach verschiedenen Inkubationszeiten entnommen, TCA gefällt, filtriert und gezählt. Der erste Messpunkt (Referenz) wird vor Zugabe von HS aus dem Ansatz entnommen.

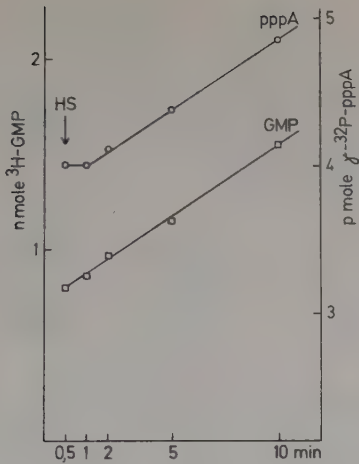


Abb. 20

Es liegt also die Vermutung nahe, dass im ρ -blockierten Zustand RNA, Enzym, DNA und ρ einen festen Komplex bilden, und bei Aufhebung des ρ -Blockes mit hohem Salz die angefangenen RNA-Ketten bis zum Salzterminationsort komplettiert werden.

Filtrationsexperimente und Gradienten bestätigen die Vermutung (Abb. 21, Tabelle 10).

Abb. 21:

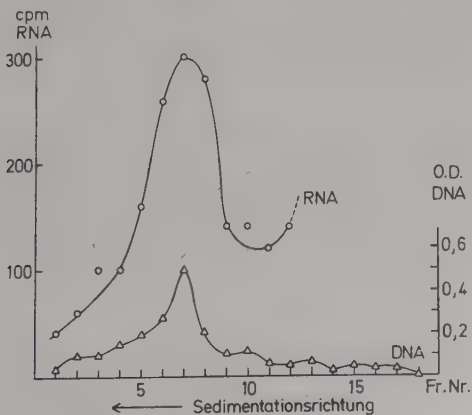


Abb.21: Sedimentationsanalyse des ρ -blockierten Zustandes in der Transcription.

Ein NS-T4-Standardansatz wurde mit sättigenden Mengen ρ bei 37°C. 45 Minuten inkubiert und in einem NS-Sucrosegradienten 70 Minuten bei 4°C. und 50000 Upm im SW.50.1-Rotor sedimentiert.
(Fraktion₁ = Boden des Gradienten)

Tabelle 10:

Puffer:	TCA	TMA	TMA + 0.2 MKCl
C14-RNA	2110	2531	2411
H3-DNA	75312	74931	74712

Charakterisierung des ρ -blockierten Zustandes durch Filtrationsexperimente.

NS-T5-Standardansätze mit der halben Enzymkonzentration (Markierung entweder durch H3-T5-DNA oder durch RNA mittels C14 ATP, 0.3 C/M) wurden 60 Minuten bei 37°C. mit sättigenden Mengen ρ inkubiert, TCA gefällt, filtriert oder nativ mit 100 ml Puffer filtriert und gezählt.
Die Werte sind in cpm angegeben.

Im ρ -blockierten Zustand bleiben DNA und RNA auf dem Filter, gleich, ob bei niedriger oder hoher Ionenstärke filtriert.
Die RNA cosedimentiert im Sucrosegradienten mit der DNA.

DNA und RNA können nur durch Enzym (und ρ) verknüpft sein.

Durch diese Experimente konnten einerseits Befunde von Goldberg (59) und Roberts (24) bestätigt werden, andererseits bleibt ein grosser Widerspruch zu Roberts Aussagen. Er gab diesem Faktor den Namen ρ für "release", d.h., seiner Meinung nach wird die RNA am ρ -Terminationsort vom Komplex freigesetzt.

Dies trifft nicht zu. Alle Gradientenzentrifugationen von ρ -Terminationskomplexen, die Roberts durchführte, sind nach SDS-Behandlung des Komplexes ausgeführt worden, sodass die Ansicht bezügl. "release" nicht länger aufrecht erhalten werden kann.

Die Feststellung von Fromageot (61), dass ρ (ähnlich σ in der Initiation) eine katalytische Rolle für die Termination spielt, steht im Widerspruch zu den Sättigungskurven von

Abb.16, die deutlich zeigen, dass mit grösserer Menge DNA oder Enzym mehr ρ für die maximale Depression nötig ist, Ausserdem ist aus den Arbeiten von Fromageot ersichtlich, dass er in den Standardansätzen überschüssige Mengen des "Terminationsfaktors" einsetzte. Man kann deshalb verstehen, dass nach Zugabe neuer Mengen DNA und Enzym auch diese der ρ -Hemmung unterliegen, die nun aber nicht auf katalytische Wirkung zurückzuführen ist, sondern auf die Präsenz überschüssiger ρ -Moleküle.

Dass ρ alteriertes und modifiziertes Enzym auch bei hoher Ionenstärke blockiert, kann in folgender Weise erklärt werden:

Eine Blockierung durch ρ findet nur dann statt, wenn die angebotene ρ -Menge im Testansatz genügt, einerseits die ρ -Orte an der DNA, andererseits die Bindungsorte am Enzym zu sättigen. Voraussetzung wäre dann aber die Bindungsfähigkeit von ρ bei hoher Ionenstärke an die DNA.

Dies kann für T4-DNA, an der alteriertes und modifiziertes Enzym getestet wurden, nicht ausgeschlossen werden, denn die Bindungsfähigkeit von ρ an die Matrize bei niedriger Ionenstärke wurde nur mit H3-markierter T5-DNA getestet, an der andere Verhältnisse als an T4-DNA existieren können.

Verständlicher ist die ρ -Aktivität bei hoher Ionenstärke, wenn man sie auf die Enzym- ρ -Bindung zurückführt.

ρ ist ein basisches Protein, vergleichbar mit der Untereinheit β' von RNA-Polymerase (siehe Material und Methoden). Da bei alteriertem und modifiziertem Enzym durch Einführen saurer Gruppen in die Untereinheit α (57) das ganze Molekül acider geworden ist, könnte die ρ -Enzymbindung entsprechend fester sein und selbst bei hoher Ionenstärke noch zustande kommen.

Um der ρ -Wirkung auf Normalenzym, alteriertem und modifiziertem Enzym an T4-DNA einen Sinn zu geben, müssten die RNA-Spezies, die mit und ohne Faktor ρ von diesen drei Enzymen synthetisiert werden, näher analysiert werden.

Die Tatsache der Nichtfreisetzung der RNA im blockierten ρ -Komplex fordert die Annahme eines Faktors in der Zelle, der dafür sorgt, dass die RNA vom ρ -Komplex freigesetzt werden kann, d.h., das in vitro System mit Faktor ρ ist noch nicht komplett.

Ähnlich wie bei der Salztermination kann man nach der Erkennung der ρ -Orte durch Enzym und Faktor ρ fragen. Der feste Komplex aus DNA, Enzym, RNA und ρ ermöglicht die Isolierung und Analyse dieser Blockierungssequenzen an der DNA und ermöglicht somit auch den Zugang zur chemischen Natur solcher Stoppsignale.

b) Terminations-Faktor κ .

Der Terminationsfaktor κ (Molekulargew. des Monomeres 17000, in TMA + 0.1 MKCl liegt es als Dimer vor, siehe Material und Methoden) wurde aus Nebenfraktionen der ρ -Aufarbeitung isoliert.

Da dieser Faktor bis heute unbekannt war, folgt in diesem Kapitel eine gründliche Analyse seiner Wirkung.

Aus den Sättigungskurven von Abb.22 lässt sich errechnen, dass eine maximale Depression der RNA-Synthese bei mittlerer Ionenstärke bei einer κ -Konzentration stattfindet, die 445 dimeren κ -Molekülen pro T7-DNA-resp. 1650 Dimeren pro T5-DNA-Molekül entspricht.

Man braucht also eine relativ hohe Konzentration von κ für optimale Aktivität. Die Sättigungsmenge ist der DNA-Menge proportional. (Tabelle 11) (a)

Abb.22

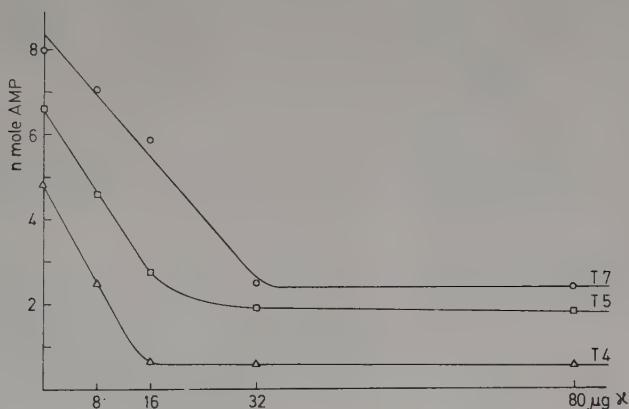


Abb.22: κ -Sättigung an T5- und T7-DNA

MS-T5- und T7-Standardansätze wurden mit steigenden Mengen κ 30 Minuten bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Tabelle 11:

- a) Abhängigkeit der κ -Menge von der DNA-Menge im Syntheseansatz.

1xDNA		2xDNA		3xDNA	
- κ	+ κ	- κ	+ κ	- κ	+ κ
3918	2120	4150	2730	4025	3250

- b) DNA- κ -Bindung bei verschiedenen Ionenstärken und verschiedener Temperatur.

					NS			
NS	MS	HS	0°C.	5°C.	10°C.	15°C.	25°C.	37°C.
18269	14748	1345	21241	20279	19676	21031	20239	18269

NS-T5-Standardansätze, die einfache, zweifache und dreifache Menge DNA enthalten, wurden mit der sättigenden Menge κ für die einfache Menge DNA 45 Minuten bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt. Die entsprechenden Referenzansätze enthielten kein κ . (a)

Jeweils 10 μg H3- T5-DNA (20970) und 10 μg κ in 0.25 ml Tris-Puffer entsprechen der Ionenstärke wurden 5 Minuten bei 37°C. (für die Ionenstärkeabhängigkeit) oder bei niedriger Ionenstärke und diversen Temperaturen inkubiert und mit je 100 ml Puffer mit den entsprechenden Ionenstärken bzw. Temperaturen filtriert und gezählt (b).

Die Werte sind in cpm angegeben.

Bei hoher Ionenstärke sind noch wesentlich höhere κ -Konzentrationen für die maximale Hemmung der RNA-Synthese nötig.

Da die maximale relative Depression der RNA-Synthese 50-60% beträgt, könnte angenommen werden, dass entweder die Hemmung unspezifisch ist, oder aber der grösste Prozentsatz der isolierten κ -Fraktion inaktiv ist.

Bindungsversuche (Tabelle 11b) mit H3-T5-DNA zeigen grosse Affinität von κ zur Matrize bei niedriger und mittlerer Ionenstärke, eine schwächere Bindungsfähigkeit bei hoher Ionenstärke.

Von dieser Tatsache ausgehend wurde die Menge von κ , die an T5 gebunden wird, durch Sedimentation in Sucrosegradienten im Ueberschuss vom Faktor untersucht.

Aus der Menge gebundenen, also mit der DNA cosedimentierenden Faktors lässt sich errechnen, dass pro T5-DNA-Molekül 1150 dimere κ -Moleküle gebunden werden. Das bedeutet praktisch dichte Packung an der DNA.

Kinetiken (Abb.23) zeigen überraschend, dass in Anwesenheit von κ bei niedriger, mittlerer und hoher Ionenstärke identische Plateaus erreicht werden, was der Ansicht einer unspezifischen Hemmung zuwidersprechen scheint, es sei denn, κ wäre in der Initiation wirksam.

Präinkubationsversuche (Tabelle 12) widerlegen die letztere Ansicht.

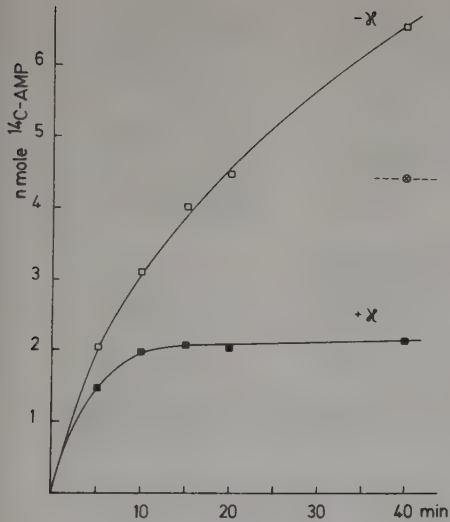


Abb.23: (Kinetik der RNA-Synthese mit und ohne κ bei hoher Ionenstärke.)

Aus doppelten T5-, NS-, MS- und HS-Standardansätzen mit und ohne sättigenden Mengen κ wurden zu verschiedenen Zeiten nach Inkubation bei 37°C. 0.1 ml Aliquote entnommen, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Abb.23.:

Kinetik der RNA-Synthese bei niedriger (LS) und mittlerer (MS) Ionenstärke.

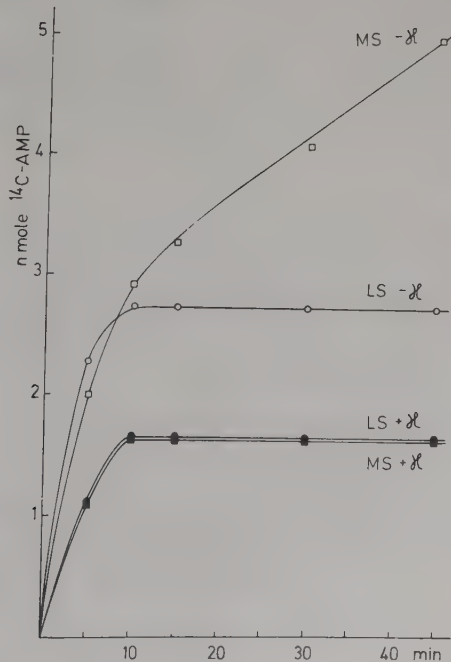


Tabelle 12: κ -Einfluss in der Präinkubation, κ -Einfluss auf SS-DNA und κ -Einfluss auf alteriertes und modifiziertes Enzym.

a)	- κ	+ κ	E+ κ	DNA+ κ	E+DNA+ κ	E+DNA+ κ +ATP,GTP,UTP
						in der Präinkubation
	3923	2420	2283	2467	2193	2372
b)	- κ	+ κ		c) SS-T5-DNA		
Emod.	981	474		- κ	+ κ	
Ealt.	512	166		474	466	

NS-T5-Standardansätze wurden mit und ohne sättigenden Mengen κ 45 Minuten bei 37°C. inkubiert (a), gleichfalls mit identischen Mengen Emod. und Ealt. (b).

Präinkubationsexperimente wurden nach 5 Minuten bei 37°C. mit den zum Standardsyntheseansatz fehlenden Agenzien komplettiert (a).

NS-Syntheseansätze mit allen Standardmengen, jedoch mit SS-T5-DNA und sättigenden Mengen κ wurden 30 Minuten bei 37°C. inkubiert.

Die Ansätze wurden nach den entsprechenden Inkubationszeiten mit TCA gefällt, filtriert und gezählt. Die Angaben sind cpm. Die Markierung erfolgte durch C14 ATP, 0.3 C/M.

Der Tabelle 12) ist zu entnehmen, dass Faktor κ nicht in der Initiation involviert ist.

Davon zeigten unabhängige Experimente, dass mit κ gleichviele Ketten pro DNA-Molekül synthetisiert wurden wie ohne κ , die jedoch eine wesentlich kürzere mittlere Kettenlänge aufwiesen. Diese Experimente bekräftigen die Aussagen der Tabelle 12. (Tabelle 14)

Aus der Tabelle 12) geht auch noch hervor, dass die Hemmung der RNA-Synthese spezifisch an nativer DNA und nicht an Einzelstrang-DNA eintritt, und dass sie auch modifiziertes und alteriertes Enzym betrifft.

Die initiale Steigung bei niedriger und mittlerer Ionenstärke mit Faktor κ ist geringer als die ohne Faktor κ in der Kinetik der RNA-Synthese von Abb.23.

Folglich muss postuliert werden, dass das Abstreifen der die Matrize fast dicht besetzenden κ -Moleküle eine Verminderung der RNA-Synthese-Rate bewirkt.

Die Kinetik bei niedriger und mittlerer Ionenstärke verläuft identisch. Die Plateauhöhe bei niedriger Ionenstärke ist definiert niedriger als die bei niedriger Ionenstärke ohne den Faktor κ . Die Kettenlängenbestimmungen mit γ -P32 ATP und H3-GTP zeigten, dass κ nicht in der Initiation beteiligt ist, und dass die RNA-Ketten definiert kürzer sind.

Daraus ist zu schliessen, dass an der Matrize einige wenige, spezifisch gebundene κ -Moleküle die RNA-Synthese blockieren, währenddem der grösste Teil der gebundenen κ -Moleküle während der Synthese abgestreift wird.

Im Mittel müssen diese κ -Blockierungsorte zwischen Initiations- und Terminationsorten liegen.

Die Blockierung der RNA-Synthese erfolgt also ähnlich der der ρ -Blockierung.

Filterbindungsversuche (Tabelle 13) und Gradientenzentrifugations-Experimente (Abb.24 a) zeigen, dass im κ -blockierten Zustand, wie beim ρ -blockierten Zustand, allerdings in diesem Falle auch bei mittlerer Ionenstärke, DNA, RNA, Enzym und κ in einem festen Komplex vorliegen müssen.

Es fehlt noch der Nachweis, dass mit Faktor κ RNA-Ketten synthetisiert werden, die definiert kürzer als die Niedrig-Salzketten sind.

Sedimentationsläufe von an T7-DNA synthetisierter κ - und Niedrig-Salz-RNA (Abb.24b) zeigen, dass die κ -spezifischen RNA-Ketten in einem scharfen Peak sedimentieren, der

definierten RNA-Ketten mit kleinerem Molekulargewicht entspricht als das der in Abwesenheit von κ synthetisierten Ketten, die im Gradienten schneller sedimentieren.

Tabelle 13:

	TCA	TMA	TMA+0.2 MKCl
C-14-RNA	574	530	591
H-3-DNA	68775	69125	67431

Charakterisierung des κ -blockierten Zustandes durch Filtrationsexperimente.

Parallele NS-T5-Standardansätze mit der halben Enzymkonzentration (Markierung entweder durch H3-T5-DNA, 70000 cpm/Ansatz, oder in der RNA durch C14 ATP, 0.1 C/M) wurden 45 Minuten bei 37°C. mit sättigenden Mengen κ inkubiert, TCA gefällt und filtriert oder nativ mit 100 ml TMA-oder TMA + 0.2 MKCl-Puffer direkt filtriert und gezählt. Die Werte sind in cpm angegeben.

Tabelle 14:

	γ -P32 pppA + pppG	H3-GMP	Kettenlänge (Nukleotidreste)
NS	1824	7231	$\approx$ 3200
NS + κ	1789	3262	$\approx$ 1450

Kettenlängen der T5-Transcripte mit und ohne Faktor κ .

NS-T5-Standardansätze wurden mit und ohne sättigenden Mengen κ 50 Minuten bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt. (Die Angaben sind cpm.) Die Markierungen waren γ -P32 ATP, (100 C/M) und H3-GTP (5 C/M).

Abb. 24a)

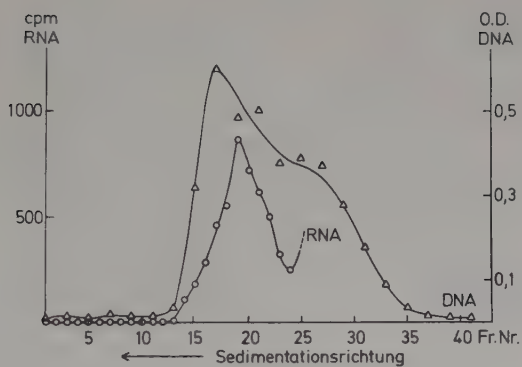


Abb. 24b)

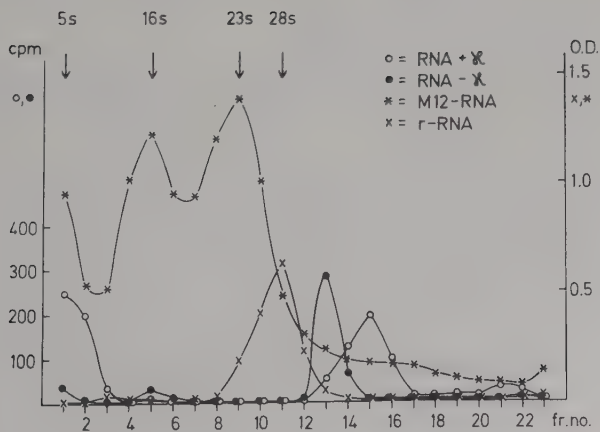


Abb.24a): Sedimentation eines κ -blockierten Synthesekomplexes im Sucrosegradienten.

Ein NS-T5-Standardansatz mit der sättigenden Menge κ wurde 45 Minuten bei 37°C. inkubiert und 105 Minuten bei 4°C. und 50000 Upm im SW.50.1-Rotor von Beckman in einem NS-Sucrosegradienten zentrifugiert.
(Fraktion1 = Boden des Gradienten).

Abb.24b): Charakterisierung der κ -RNA im Gradienten.

Ein NS-T7-Standardansatz (markiertes Substrat = α -P32 ATP, 5 C/M) wurde mit sättigenden Mengen κ 45 Minuten bei 37°C. inkubiert. Die RNA wurde anschliessend formyliert. Der Ansatz wurde dann in einem Formaldehyd-Sucrosegradienten 150 Minuten bei 4°C. und 50000 Upm im SW.50.1-Rotor von Beckman sedimentiert.

Als Referenz wurden r-RNA und M12-RNA identisch der T7- spezifischen RNA behandelt und zentrifugiert. Fraktions-Nr.23=Boden des Gradienten.

Eine weitere Methode zur Charakterisierung der Transcripte, die in Anwesenheit von Faktor κ synthetisiert werden, ist die Hybridisierung und die Hybridisierungskompetition (Abb.25).

Sowohl Hybridisierungssättigungskurven als auch Hybridisierungskompetition von κ -RNA und normaler RNA zeigen, dass in Anwesenheit von Faktor κ RNA-Spezies synthetisiert werden, die nicht alle, aber einen beträchtlichen Teil, nämlich ca. 55%, Spezies der RNA enthalten, die ohne Faktor κ synthetisiert werden.

Auch diese Experimente bestätigten die Spezifität der κ -Wirkung an der Matrize.

Die Tatsache, dass ρ nur bei niedriger Ionenstärke, κ bei allen Ionenstärken aktiv ist, ρ an T4-DNA 85%, κ 50%-60% Depression zeigt, lässt vermuten, dass speziell für T4-DNA im Mittel der ρ -Ort vor dem κ -Ort liegt.

Bei T5- und T7-DNA findet wir in beiden Fällen ca.50% Depression der RNA-Synthese, sodass die Entscheidung schwerer sein dürfte.

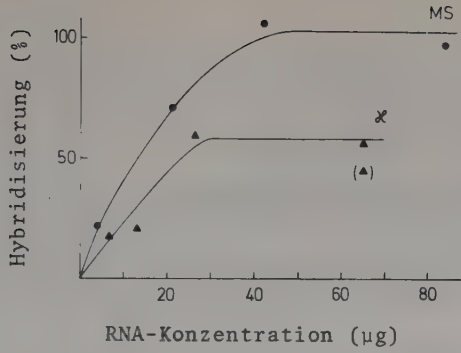


Abb. 25)

b)

c)

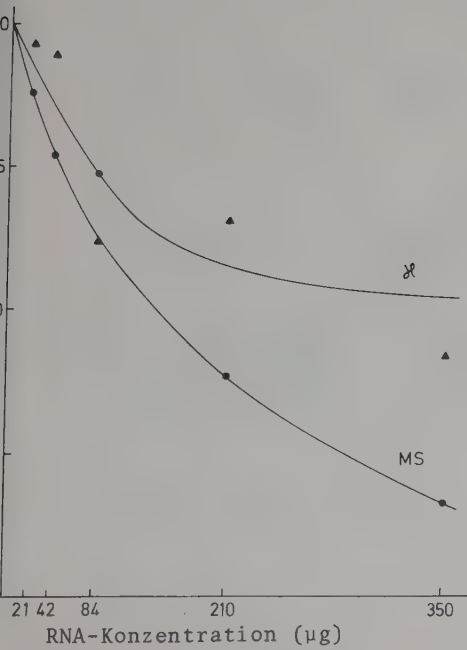
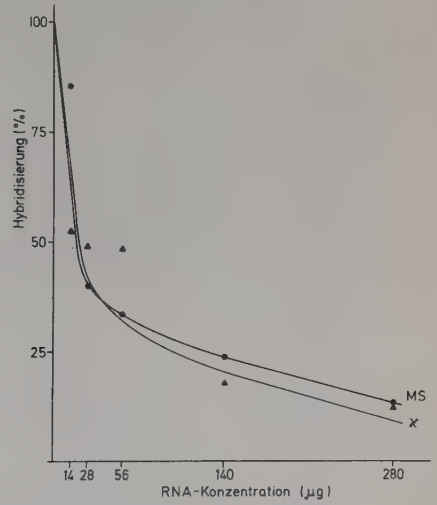


Abb.25: Charakterisierung der κ -Transcripte durch Hybridisierung und Hybridisierungskompetition.

Abb.a) Hybridisierungs-Sättigungskurven von κ -RNA und MS-RNA.

Abb.b) Hybridisierungskompetition von C14-markierter κ -RNA mit unmarkierter MS-RNA (Autokompetition).

Abb.c) Hybridisierungskompetition von C14-markierter MS-RNA mit unmarkierter κ -RNA.

Die Sättigung von T5-spezifischer κ -RNA liegt bei 32%, vergleichsweise die von T5-spezifischer MS-RNA bei 56%. In der Abb. a) sind die 56% der MS-RNA = 100% gesetzt.

Man sollte also an T4-RNA bei niedriger Ionenstärke in Anwesenheit von ρ und κ RNA-Synthese bis zum ρ -Ort erhalten, und müsste bei Erhöhung der Ionenstärke (Aufhebung des ρ -Blockes!) Weitersynthese bis zum κ -Ort finden.

Die Werte in Tabelle 15) zeigen, dass dies in der Tat der Fall ist.

Tabelle 15:

	a	b	c	d	e
-Faktoren	+ ρ (NS)	+ κ (NS)	+ κ (MS)	+ ρ + κ (NS)	+ ρ + κ (MS)
5788	1023	2813	2771	1112	2782

ρ -und κ -Blockierung an T4-DNA.

NS- und MS-T4-Standardansätze (Markierung durch C14- ATP, 0.3 C/M) wurden mit sättigenden Mengen ρ , κ oder ρ und κ 45 Minuten bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt. Die Angaben sind cpm.(a-e)

Die Werte a und e wurden auch dann erhalten, wenn für 30 Min. ρ im Ansatz bei niedriger Ionenstärke zugegen war und erst anschliessend unter Erhöhung der Ionenstärke auf MS und gleichzeitiger Zugabe von κ 30 Minuten weiterinkubiert wurde.

Nur bei hoher κ -Konzentration findet man 100%ige κ -Blockierung.

In der Tat sind in E.coli-Zellen grosse Mengen κ präsent.

Man isoliert aus dem gleichen Ausgangsmaterial etwa die zehnfache Menge κ als ρ , (siehe Material und Methoden) bezügl. seinem Molekulargewicht Mengen, die der RNA-Polymerase entsprechen, d.h. mehrere tausend Moleküle pro Zelle.

Allerdings muss auch hier gesagt werden, dass das System der κ -Blockierung nicht komplett ist. Gerade mit Faktork werden bei allen Ionenstärken RNA-Spezies synthetisiert, die nur einen Teil der Sequenzen der totalen m-RNA, bezogen auf die Salz-Termination enthalten. Es müssen deshalb zwingend Faktoren in der Zelle postuliert werden, die den κ -Zustand aufheben können, um weitere Synthese zuzulassen.

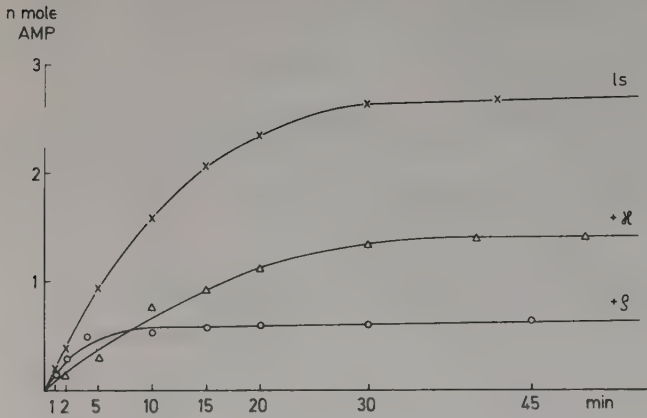
Ueber die physiologische Rolle von κ in der Zelle lässt sich nichts aussagen bis der Beweis geführt ist, dass ρ wie auch κ ein in vivo wirksamer spezifischer Transcription-Faktor ist.

Wie bei ρ kann man hoffen, nach Isolierung und Analyse der κ -Blockierungsorte an der DNA Auskunft über die Erkennung dieser Orte zu erhalten.

In den letzten Kapiteln wurden vier Kettenabbruch-Orte beschrieben. Die relative Position dieser Orte, die sich aus der Plateauhöhe der einzelnen Kinetiken bei niedriger Ionenstärke ergibt (Abb.26a), ist in Abb.26b) dargestellt.

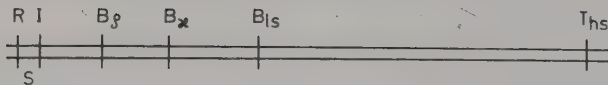
Es ist nicht ausgeschlossen, dass weitere Terminations- und Blockierungs-Faktoren mit spezifischen Aufgaben in der Zelle existieren. Interessant ist die Frage, ob nach Infektion der E.coli-Zelle mit Bakteriophagen solche Faktoren, z.B. durch chemische Veränderungen, inaktiviert werden oder für die Transcription der Phagen-Gene neue Spezifitäten erhalten.

Abb.26a)



Kinetiken der RNA-Synthese mit und ohne Faktoren bei niedriger Ionenstärke (ls). Bedingungen siehe frühere Abbildungen.

Abb.26b)



Durchschnittliche Positionen der ρ-, κ-, Niedrigsalz-Blockierungsorte und der hohen Salz-Terminationsorte in einer Leseinheit der T4-DNA.

Blockierungsorte = B
 Terminationsort = T
 niedrige Ionenstärke = ls
 hohe Ionenstärke = hs

II. Die Initiation und die Elongation

1. Die Initiation

a) Zwei unterscheidbare Zustände in der Initiation. Die Kinetiken des Anlegens des Nukleosidtriphosphat-Beginns einer RNA-Kette (Abb.7) zeigen bei niedriger und hoher Ionenstärke vollkommen differente Verläufe.

Während bei niedriger Ionenstärke über die gesamte Zeit bis zum Plateau der RNA-Synthese Kettenanfänge entstehen, ist bei hoher Ionenstärke dieser Prozess sehr schnell.

Die von Anfang an lineare Synthese bei hoher Ionenstärke und die langsam ins Plateau führende Synthese bei niedriger Ionenstärke können durch Geschwindigkeits-bestimmende Schritte in der Initiation oder Elongation prädestiniert sein.

Die langsame Kinetik bei niedriger Ionenstärke wird auch beobachtet, wenn Initiation nur durch ein Enzym-Molekül pro Promoter zugelassen wird, indem man eines der Substrate (CTP) aus dem Syntheseansatz weglässt, sodass Elongation nicht stattfinden kann (Abb.27).

Abb.27

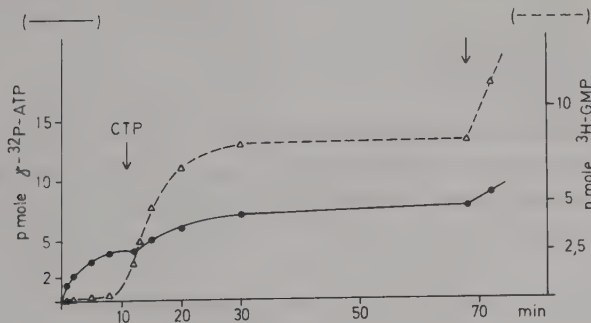


Abb.27: Kinetik der Initiation und RNA-Synthese an T5-DNA.

Ein vierfacher NS-T5-Standardansatz mit der doppelten Menge Enzym und mit markiertem γ -P32 ATP, H3-GTP wurde bei 37°C. inkubiert.

Eines der vier Substrate (CTP) wurde erst nach 10 Minuten Inkubationszeit zugegeben. Zu diversen Zeiten, auch schon vor Zugabe von CTP, wurden 0.1 ml Aliquote entnommen, TCA gefällt und filtriert wurden die Aliquote erst, nachdem das vierte Substrat dem Ansatz zugegeben wurde. Vor Zugabe von CTP wurden die Aliquote mit TMA filtriert und gezählt.

Nach 70 Minuten Synthese wurde die Ionenstärke auf Hohes Salz erhöht und ein weiterer Messpunkt durch Entnahme eines Aliquotes ermittelt.(Pfeil).

Nach ungefähr 10 Minuten ist der Prozess der Initiation bei niedriger Ionenstärke abgeschlossen. Die Menge des angelegten γ -P32-Kettenbeginnes in Abb.27) entspricht nach 10 Minuten ungefähr der Hälfte der Menge Enzym im Ansatz, gerechnet als Monomer.

Nach Zugabe von CTP sieht man, abgesehen vom Einsetzen der RNA-Synthese, eine weitere, langsame Phase des Erscheinens neuer RNA-Beginne, die ein Plateau nach weiteren 10 Minuten erreicht, das bei dem gewählten Enzym/DNA-Verhältnis etwa die doppelte Höhe des ersten erreicht.

Die eingesetzte Menge Enzym richtete sich nach der von Bautz (49) angegebenen Promotorenzahl und ist in diesem Fall um den Faktor zwei zu gross, vorausgesetzt, dass es keine AC...-Initiatoren gibt, d.h., T5-DNA besitzt anstelle von 35 Promotoren höchstens 17 bis 20 Promotoren (siehe auch Kapitel I).

Ausserdem kommt man durch Rechnung auf 15 Promotoren, wenn man die bei mittlerer Ionenstärke transkribierte Fraktion eines T5-DNA-Moleküls, die aus RNA-Sättigungskurven der Hybridisierung im ersten Abschnitt der Arbeit zu 56 % bestimmt wurde, ausgedrückt in XMP-Resten, durch die Zahl der in einer Kette mittlerer Länge eingebauten XMP-Reste (4000 pro Kette) dividiert.

Die gleiche Rechnung, für T4-DNA angesetzt, ergibt 6 Promotoren, nicht 25 (Bautz, 49).

Sauerbier (76) findet mit einer anderen Technik an T4-DNA 10 bis 12 frühe m-RNA-Spezies, allerdings mit der Grundlage $MG_{T4-DNA} = 130$ Mio. statt 105 Mio (64) und einer erheblich geringeren mittleren Kettenlänge.

Die mittlere Kettenlänge, die sich aus dem Verhältnis von synthetisierten pppA- und pppG-Kettenanfängen zum Nettoeinbau ergibt, ist die gemittelte Länge aller an einer bestimmten Matrize synthetisierten Ketten.

Wenn Leseeinheiten überlappen, oder wenn von Leseeinheiten von verschiedener Länge durch konsekutive Initiation oder Reinitiation verschiedene Zahlen an Kopien synthetisiert werden, kann die so berechnete mittlere Kettenlänge (Zahlenmittel) stark von der reellen abweichen, die durch Mitteln der Längen der durch einmalige Transcription jeder Leseinheit gebildeten RNA-Spezies (Längenmittel) erhalten wird.

Letzteres kann auch direkt gemessen werden: Bei niedriger Ionenstärke werden nur die RNA-Moleküle freigesetzt, die durch Enzymmoleküle synthetisiert werden, die den Terminator erreicht haben. Alle weiteren Enzymmoleküle, die auf das erste am Terminationsort gebundene aufgelaufen sind, können ihre Transkripte nicht freisetzen.

Wird ein solcher Synthesekomplex über Cellulosenitrat filtriert, so lässt sich die freigesetzte RNA im Filtrat mit TCA fällen. Durch Doppelmarkierung (γ -P32 ATP und GTP, H3 UTP) liess sich die echte mittlere Kettenlänge (Längenmittel) an T5-DNA zu 4000 Nukleotid-Resten pro Kette bestimmen.

Die mit dieser unabhängigen Methode neu bestimmte Kettenlänge unterscheidet sich nicht von der Kettenlängenbestimmung (Zahlenmittel) der vorhergehenden Experimente. Durch Rechnung ergibt sich wieder eine Zahl von 15 Terminatoren.

Die direkte Analyse der Kettenanfänge ergibt 11 Ketten, die mit pppA anfangen und 3 Ketten, die mit pppG anfangen.

Die an jedem T5-DNA-Molekül freigesetzte Anzahl Ketten entspricht der Anzahl Terminatoren.

Die praktische Identität zwischen Zahlen- und Längenmittel der Kettenlänge indiziert, dass entweder alle Leseinheiten auch bei Zulassen von Reinitiation etwa gleich oft transkribiert werden oder die Längen der Transkripte verschiedener Leseinheiten nicht sehr verschieden sind.

Die langsame Kinetik der Initiation bei niedriger Ionenstärke erhält man auch, wenn durch Heparinzusatz zum Ansatz unspezifisch gebundenes Enzym inaktiviert und konsekutive Initiation durch freies Enzym unterbunden wird. (19, Abb.28)

Abb.28

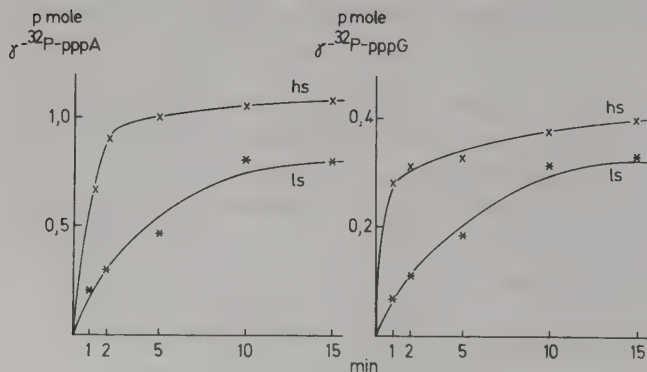


Abb.28: Kinetik der Initiation unter Kurzzeit-Heparin-Einwirkung an T5-DNA.

Vierfache NS- und HS-T5-Standardansätze mit der doppelten Menge Enzym wurden nach 1 Minute Präinkubation bei 37°C. vor Substratzugabe noch 90 Sekunden mit 0.2 mg Heparin inkubiert. Aliquote von 0.2 ml wurden nach verschiedenen Zeiten nach Substratzugabe entnommen.

Jeweils GTP oder ATP waren γ -P32-markiert.

ls = Kinetik bei niedriger Ionenstärke.

hs = Kinetik bei hoher Ionenstärke.

Die Kettenanfänge wurden mit γ -P32 ATP und γ -P32 GTP gemessen. Das Verhältnis von A:G-Startern ist an T4-DNA 4:1, an T5-DNA 3:1 bei niedriger und hoher Ionenstärke, an T7-DNA bei niedriger Ionenstärke 3:1, bei hoher Ionenstärke 1:1, ein Hinweis auf Promotoren verschiedener Affinität.

Die ins Plateau führende Kinetik der RNA-Synthese bei niedriger Ionenstärke ist nicht Ausdruck geringer Elongationsrate. Dies geht aus der Kurvenschar in Abb.29) hervor.

DNA-Enzym und 3 Triphosphate wurden nach Zusatz von Heparin 10 Minuten lang präinkubiert. Durch Zugabe des vierten Substrates wurde die Synthesephase gestartet, die nach Erreichen des Terminationsortes wegen der darauffolgenden Inaktivierung des Enzyms durch das Heparin in jedem Falle beendet ist.

In allen drei Fällen, bei niedriger Ionenstärke, niedriger Ionenstärke mit einer der üblichen hohen Ionenstärke entsprechenden Mg-Konzentration und bei hoher Ionenstärke werden die etwa gleich hohen Plateaus schnell und praktisch zur gleichen Zeit erreicht.

Die durchschnittliche Syntheserate, die auch die Anfänge nicht mehr wachsender Ketten berücksichtigt, ergibt sich aus Kurve 7a) zu ca. 60 Nukleotidresten pro Sekunde pro synthetisierendes Enzymmolekül.

Abb. 29

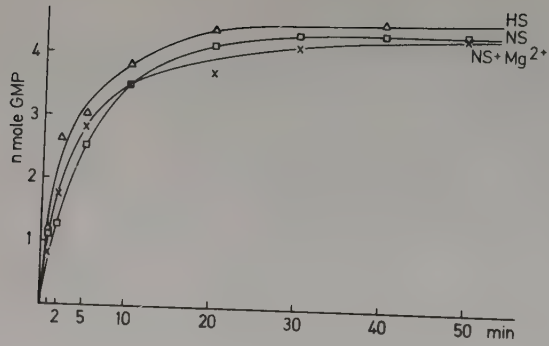


Abb. 30

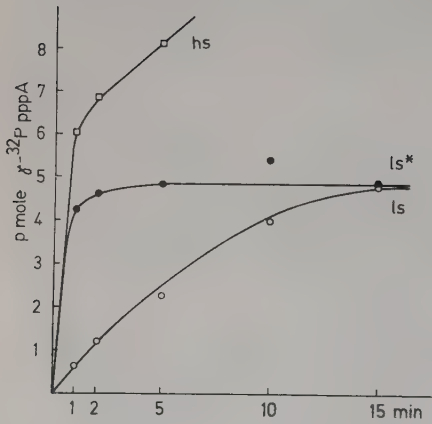


Abb. 31

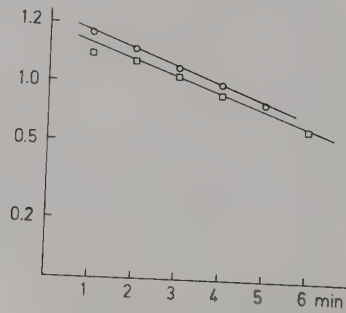


Abb.29: Bestimmung der Rate der RNA-Synthese bei verschiedenen Ionenstärken.

Ein vierfacher NS-T5-, HS-T5- und NS-T5-Standardansatz mit additiven 0.04 M Mg-Acetat wurde in Abwesenheit von CTP 10 Minuten bei 37°C. & 10 Minuten in Anwesenheit von Heparin präinkubiert.

Nach Zugabe von CTP wurden zu verschiedenen Zeiten 0.1 ml Aliquote entnommen, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Abb.30: Die Umwandlung des verzögerten in den unmittelbaren Starter.

Von einem vierfachen NS- oder HS-T5-Standardansatz mit markiertem γ -P32 ATP werden 0.2 ml Aliquote zu verschiedenen Zeiten nach Inkubation bei 37°C. entnommen, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Einer der Niedrig-Salzansätze (1s*) wurde bei 37°C. 10 Minuten präinkubiert, bevor die Substrate dazugefügt und Aliquote entnommen wurden.

Abb.31: Logarithmische Abhängigkeit der Steigung der Initiationskinetik von der Zeit aus Abb.28) (linke Kinetik).

Die initiale Rate der RNA-Synthese beträgt ca. 500 Nukleotidreste pro Sekunde.

Die schnelle Synthese unter allen Salzbedingungen, die durch Präinkubation von DNA-Enzym und 3 Nukleosidtriphosphaten in Gegenwart von Heparin ins Plateau führt, legt nahe, dass die langsam die langsam ins Plateau führende Synthesekinetik bei NS durch einen Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt in der Initiation zustande kommt.

Präinkubiert man bei niedriger Ionenstärke 10 Minuten lang DNA und Enzym, startet mit den Substraten und verfolgt das Anlegen der Kettenanfänge, so stellt man fest, dass nach dieser Präinkubationsphase auch bei niedriger Ionenstärke das Anlegen der pppA- und pppG-Kettenanfänge schnell geworden ist, und zwar etwa gleich schnell wie bei hoher Ionenstärke. (Abb. 30)

Da kein Substrat in der Präinkubationsphase anwesend war, ist die Bildung des Anthony-Goldthwait-Komplexes (32), die bei niedriger Ionenstärke vielleicht langsamer sein könnte als bei hoher, ausgeschlossen.

Dieser langsame Uebergang mit einer Kinetik 1.Ordnung an der Matrize und einer Halbwertszeit von 3.5 Minuten an T5-DNA (Abb.31) lässt sich auf eine Konformationsänderung zurückführen. Das Enzym gelangt aus einem Zustand ("verzögerter Starter") in einen zweiten, dem "unmittelbaren Starter".

Frühere Arbeiten von Zechel (35) zeigen für die Bildung des Heparin-stabilen Initiationskomplexes eine strenge Temperaturabhängigkeit ähnlich der Schmelzkurve einer DNA mit einem " T_M " von 17.5°C . für E.coli-Enzym an T4-DNA bei niedriger Ionenstärke.

Da dieses Profil nur nach langen Präinkubationszeiten mit Heparin zu beobachten war, muss es die Temperaturabhängigkeit des Ueberganges des "verzögerten" in den "unmittelbaren Starter" sein.

Die Initiation kann demnach als ein Vierschritt-Prozess aufgefasst werden, unterteilbar in

1. die schnelle Bildung eines Heparin-sensitiven Enzym-DNA-Komplexes,
2. den schnellen Uebergang in einen Heparin-geschützten Zustand, "verzögerter Starter" genannt,
3. einen langsamen, hoch kooperativen Uebergang in einen zweiten Heparin-stabilen Zustand, den "unmittelbaren Starter", und
4. die Bindung von Purinribonukleosidtriphosphat an den Komplex, die der Knüpfung der ersten Internukleotidbindung unmittelbar vorausgeht.

Der Initiationsfaktor σ wird bereits im zweiten Schritt benötigt (35), und zwar in stöchiometrischer Menge.

b) Ein neues Modell des Promoters.

Die von Bautz bestimmte, um den Faktor 2.5 zu hohe Anzahl Promotoren an T5-DNA, die er mit der Rifampicin-Technik erhielt, gibt Anlass zur Frage, ob Heparin- oder Rifampicin-resistente Komplexe von DNA und Vollenzym ein direktes Mass für die Zahl der Promotoren sind, oder ob die Möglichkeit besteht, dass mehrere Enzymmoleküle pro Promoter Inhibitor-resistent werden können. (Rifampicin besitzt ähnliche Wirkung wie Heparin. Durch die Bindung an die Untereinheit β wird das Enzym inaktiviert, 67.)

Dies erfordert eine genauere Analyse der diversen Initiationsakte in Abhängigkeit von der Enzymmenge bei verschiedenen Ionenstärken.

Ähnlich wie an T4-DNA (35) erhält man an T5-DNA "Zerfalls-kinetik" des Präinitiationskomplexes in Gegenwart von Heparin, die zweiphasig ist (Abb.32).

Abb.32

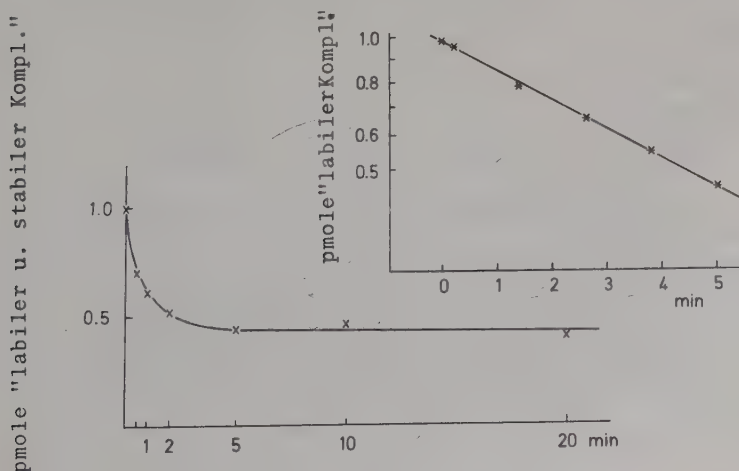


Abb.32: Die Heparinzerfallskinetik des Präinitiationskomplexes an T5-DNA.

Nach 15 Minuten Präinkubation eines Ansatzes bei niedriger Ionenstärke, der 0.1 mg T5-DNA und 0.02 mg Vollenzym pro 0.5 ml enthielt, wurde 0.1 mg Heparin dazugegeben, zu verschiedenen Zeiten danach 0.05 ml Aliquote entnommen und zu einem Ansatz gegeben, der mittlere Ionenstärke und je 1 mM UTP, GTP, CTP, C14ATP enthielt. (Spez.Aktivität: 0.1 C/M.)

Die Synthesephase betrug 10 Minuten. Zu verschiedenen Zeiten herausgenommene Aliquote wurden TCA gefällt, filtriert und gezählt (untere Kurve).

Die obere Kurve stellt die Kinetik des Zerfallens der "labilen" Komplexe in logarithmischer Auftragung dar.

Der weniger stabile Teil zerfällt in einer Reaktion 1.Ordnung mit einer Halbwertszeit von 60 Sekunden (Abb.32), gefolgt von einer zweiten Zerfallsphase mit einer Halbwertszeit von über 100 Minuten.

Der schnell zerfallende Teil (30 bis 50%) der geschützten Komplexe wird als der labile, der langsam zerfallende als der stabile Anteil bezeichnet.

Das Verhältnis beider Klassen für eine bestimmte Matrize ist unabhängig von der Präinkubationszeit von Enzym und DNA vor Heparinzugabe und unabhängig vom Verhältnis der Mengen von Enzym und DNA. (Abb.33a, Tabelle 16).

Tabelle 16:

Präinkubation	30 sec.	15 min.
stabile Komplexe	7852	8274
labile Komplexe	3682	3982

Heparinstabilität in Abhängigkeit von der Präinkubationszeit von Enzym und DNA.

Bedingungen siehe Abb.32) mit dem Unterschied, dass die zehnfache Enzymkonzentration in den Präinkubationsansätzen, die 30 sec. und 15 min. bei 37°C. verweilten, zugegen war.

Labile Komplexe = Totalkomplexe (Heparin mit den Substraten gleichzeitig gegeben) minus stabile Komplexe (Substrat nach 10 Minuten Heparineinwirkung auf den präformierten Enzym-DNA-Komplex.)

Abb.33a)

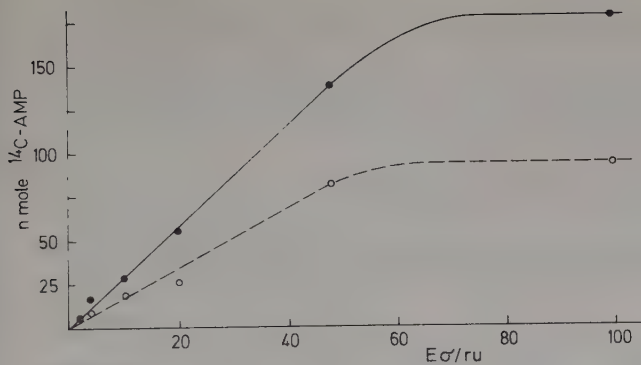


Abb.33b)

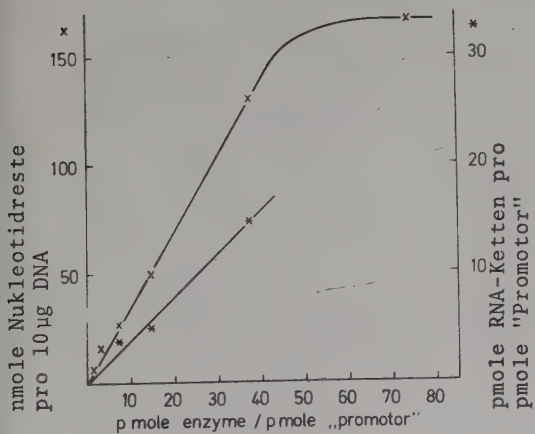


Abb.34)

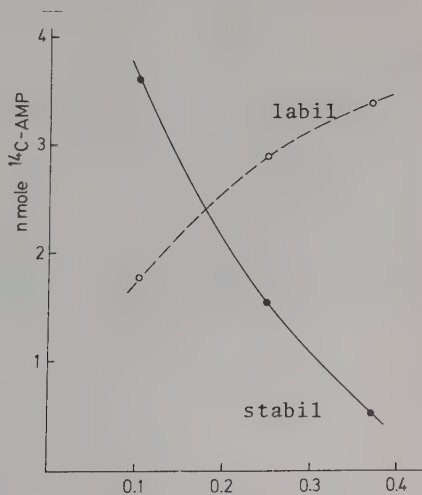


Abb.33a: Enzymabhängigkeit der labilen und stabilen Komplexe.

Bedingungen siehe Abb.32), mit Ausnahme, dass nur die Aktivität der stabilen und labilen Komplexe in Abhängigkeit steigender Mengen Enzym im Ansatz bestimmt wurde. (ru=Leseeinheit)

Gestrichelte Linie = labile Komplexe, und durchgezogene Linie = stabile Komplexe.

Abb.33b: Anzahl Enzymmoleküle, die im Durchschnitt in einem Präinitiator von T5-DNA Heparin-stabile Starter sind.

Bedingungen siehe Abb.33a). Die Anzahl Ketten, die von der Anzahl stabiler Komplexe im Präinitiator synthetisiert werden, waren durch Markierung der Kettenanfänge mit γ -P32 pppA gemessen worden.

Abb.34: Die Abhängigkeit der labilen und stabilen Komplexe von der Ionenstärke.

Bedingungen siehe Abb.32) mit Ausnahme, dass labile und stabile Komplexe in Präinkubationsansätzen mit steigender Ionenstärke (μ) gebildet wurden.

So ist auszuschliessen, dass der labile Teil ein Vorläufer des stabilen Teiles ist.

Ein weiterer Unterschied zwischen der labilen und stabilen Klasse besteht darin, dass die stabile Klasse nicht durch Zugabe grosser Mengen Minimalenzym beeinflusst wird, während die labile Klasse durch überschüssiges Minimalenzym vollständig gelöscht (kompetiert) wird. (35). Dies heisst, dass Initiationsfaktor σ zur Erkennung der labilen Orte nicht gebraucht wird, aber an diesen für den Initiationsakt.

Diese Tatsache lässt die Funktion von σ als Erkennungsfaktor zweifelhaft erscheinen. σ muss eher als Effektor der Initiation betrachtet werden.

Ein weiterer Unterschied beider Klassen ist, dass die Anzahl der stabilen Komplexe an T5-DNA mit steigender Ionenstärke abnimmt, während die der labilen stark zunimmt (Abb.34.).

Zählt man nun die Ketten, die mit steigendem Enzymangebot durch stabilgewordene Starter in Gegenwart von Heparin synthetisiert werden, so überrascht, dass bei fast gleicher Kettenlänge von einem Promoter aus mehrere Ketten begonnen werden.

Allerdings wird mit steigender Enzymmenge keine Sättigung bezügl. Kettenanfängen beobachtet, sodass bei grossem Enzymüberschuss die Kettenlänge drastisch gesenkt wird.

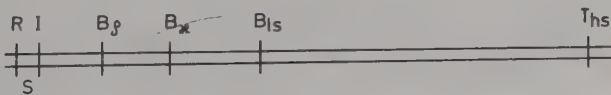
Der Anteil pppA-Anfänge, der von den labilen Startern synthetisiert wird, ist, verglichen mit der Nettosynthese, gering (10% pppA-Anfänge verglichen mit 30-50% Nettosynthese).

Man kann in Einklang mit den Beobachtungen ein Modell des Anteiles der Initiationsorte aufstellen, an denen stabile Präinitiationskomplexe gebildet werden:

Enzymmoleküle können bis zu einer gewissen Anzahl über einen primären Erkennungs- (Eintritts-) Ort in eine Strecke an der DNA, genannt Präinitiator, gelangen, die vor dem Initiator liegt.

Dieses Element des Promoters würde erstens eine Speicherfunktion erfüllen, zweitens einen geschützten Aufenthaltsort für diejenigen Enzymmoleküle bereitstellen, die nicht in Synthese begriffen sind (Abb.35).

Abb.35)



Das neue Modell des Promoters.

R= Erkennungs- oder Eintrittsort der Polymerase an der DNA

S= Präinitiator

I= Initiator

R+S+I= P=Promoter

Sinnvoll für eine schnelle Derepression unabhängig vom "pool" freien Enzyms wäre dann zusätzlich, wenn der Bindungsort des Repressors hinter dem Präinitiator liegen würde.

Im Fall der Phageninfektion ohne Modifikation der Polymerase von E.coli könnten grosse Präinitiatorstrecken die Kompetitionschance der Phagen-DNA mit der Wirts-DNA verbessern.

Der direkte Beweis für die Präinitiatormodelle wären elektronenmikroskopische Aufnahmen. Doch geben auch Arbeiten von Blattner et al. (68) Hinweise auf ein solches Modell. Diese Autoren konnten zeigen, dass der genetisch definierte Promoter links der Immunitätsregion des Phagen λ einige hundert Nukleotidpaare rechts vom Startpunkt der Transcription des N-Gen-messengers liegt.

Eine weitere Unterstützung für das Präinitiatormodell liefern Experimente (Tab. 17), in denen man Terminatoren bei niedriger Ionenstärke in Gegenwart von Heparin misst.

Tabelle 17:

	1 E/LE	5 E/LE
TMA	55	1312
TCA	322	1609

Anzahl terminierte Enzymmoleküle bei niedriger Ionenstärke in Gegenwart von Heparin, bei einem und fünf stabilen Komplexen im Präinitiator.

25 μ g T5-TNA und 5 μ g resp. 25 μ g Vollenzym wurden bei niedriger Ionenstärke (totales Volumen 0.05 ml) 10 Minuten bei 37°C. präinkubiert, mit je 100 μ g Heparin weitere 10 Minuten bei 37°C. inkubiert, anschliessend in 0.2 ml Synthesemix niedriger Ionenstärke für 45 Minuten bei 37°C. weiterinkubiert, TCA gefällt, filtriert, oder mit 100 ml TMA filtriert und gezählt. Die Werte sind in cpm angegeben. Die Markierung der RNA erfolgte durch C14 ATP, 1 C/M.

Unter diesen Bedingungen terminiert bei niedriger Ionenstärke nur ein Enzymmolekül korrekt, d.h., es setzt ein Transcript frei, auch wenn mehr als ein Molekül pro Leseinheit initiiert hat. Die überschüssigen Enzymmoleküle laufen auf und können die synthetisierte RNA nicht freisetzen.

Aus allen durchgeführten Versuchen sind drei Modelle bezügl. Initiationsorte möglich:

1. Pro Terminationsort an der DNA existieren mehrere, statistisch verteilte Initiationsorte. Die Leseinheiten würden in diesem Falle überlappen.
2. Die Initiationsorte liegen dicht beisammen und haben wie in 1) einen gemeinsamen Terminationsort. In diesem Falle wären die RNA-Ketten nur unwesentlich in der Länge voneinander verschieden. Allerdings hätte jede Kette ihre bestimmte Anfangssequenz.
3. Der Promotor setzt sich zusammen aus
 - a) einer Eintrittsstelle an der DNA für die Polymerase,
 - b) dem Präinitiator,
 - c) dem Initiationsort, der dem Präinitiator folgt.

Multipliziert man die Terminatorzahl mit der mittleren Kettenlänge der Transkripte von T5-DNA, so erhält man eine gesamte transkribierte Strecke, die derjenigen entspricht, die man aus Hybridisierungs-Sättigungskurven erhält.

Damit kann das in Punkt 1) beschriebene Modell ausgeschlossen werden.

Durch unsere und Blattner's Resultate wird das Modell von Absatz 3) favorisiert.

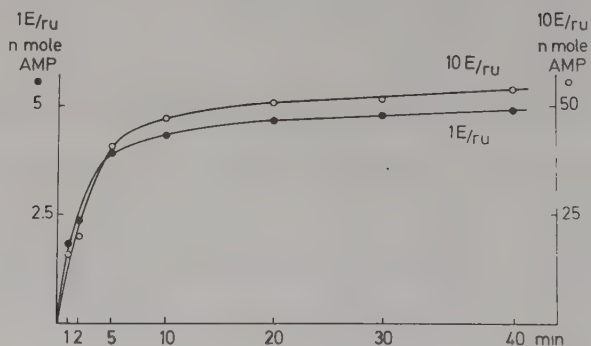
Die Existenz des Präinitiators stellt die Charakterisierung des Promoters nach Isolierung der unter dem Enzym gebundenen DNA-Stücke infrage. Man würde bei einem angebotenen Enzymmolekül pro Promoter vielleicht den Initiator bei mehr als einem zunehmend Teile des Präinitiators isolieren.

Völlig ungeklärt bleibt die Bedeutung des labilen Anteiles des Präinitiationskomplexes. Man könnte sich vorstellen, dass dieser Enzym darstellt, das unspezifisch an die Matrize, z.B. an Einzelstrangbrüchen der DNA, gebunden ist, oder am falschen Strang initiiert.

Schliesslich muss noch erwähnt werden, dass der Uebergang von verzögerten Startern in unmittelbare Starter nicht mit dem Uebergang vom Präinitiator zum Initiator identisch ist.

Präinkubiert man 10 Minuten lang einerseits DNA mit einem Enzymmolekül, andererseits mit fünf Enzymmolekülen pro Leseinheit und verfolgt nach Heparinzugabe die Kinetik der RNA-Synthese für den stabilen Präinitiationskomplex, so sieht man, dass in beiden Fällen der Uebergang der verzögerten zu den unmittelbaren Startern vollständig ist (Abb.36).

Abb.36:



Umwandlung der verzögerten in die unmittelbaren Starter in Abhängigkeit von der Enzymmenge.

150 µg T5-DNA, 15 bzw. 150 µg Enzym bei niedriger Ionenstärke (Vol.=0.75 ml) werden 10 Minuten bei 37°C. präinkubiert, mit 200µg Heparin versetzt, weitere 10 Minuten

bei 37°C. inkubiert und mit 0.75 ml Synthesemix mittlerer Ionenstärke vereinigt. Die Markierung der RNA erfolgte durch C14 ATP im Syntheseansatz (1 C/M.). Nach diversen Zeiten der Synthese wurden den Inkubationsansätzen 0.2 ml Aliquote entnommen, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

ru= LE

Nur zwei Modelle kommen hierfür infrage:

1. Der Uebergang der verzögerten in die unmittelbaren Starter ist eine Konformationsänderung am Enzym und findet an allen im Präinitiator und Initiator gebundenen Enzymmolekülen statt.
2. Der Uebergang ist eine Konformationsänderung am Initiator (z.B. Strangtrennung eines DNA-Stückes), den nur das Initiator-gebundene Enzym vollzieht, die aber erhalten bleibt, sodass die im Präinitiator gebundenen Moleküle nachrücken können, ohne diesen Akt erneut vollziehen zu müssen.

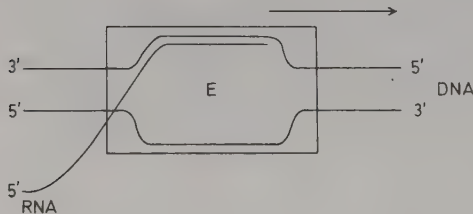
Die Konformationsänderung am Initiator ist weniger wahrscheinlich, da bei grossem Enzymüberschuss ohne Präinkubation und in Abwesenheit von Heparin, also unter Bedingungen, die konsekutive Initiation durch freies Enzym erlauben, die Plateauierungszeit stark zunimmt (Abb.3). Freies Enzym muss also offenbar den Akt der Konformationsänderung vor der Initiation neu vollziehen.

2. Die Elongation

Der langsame, hoch kooperative Uebergang in den zweiten Heparin-stabilen Zustand als Prozess oberhalb einer bestimmten Grenztemperatur ($T_M=17.5^{\circ}\text{C.}$) lässt sich u.a. durch die Annahme erklären, dass ein Stück der DNA aufgeschmolzen wird(69). Diese aufgeschmolzene Strecke könnte sich während der Elongationsphase wie eine Welle mit dem Enzym entlang der DNA bewegen, sodass die exakte, komplementäre Sequenz der synthetisierten RNA durch direkte Basenpaarung mit dem codogenen Strang der DNA gewährleistet wäre.

Das stationäre Modell des aktiven Komplexes würde wie folgt aussehen: Unter dem Enzym ist die DNA geschmolzen. Am codogenen Strang liegt die synthetisierte RNA in hybridisierter Form vor (Abb.37).

Abb.37)



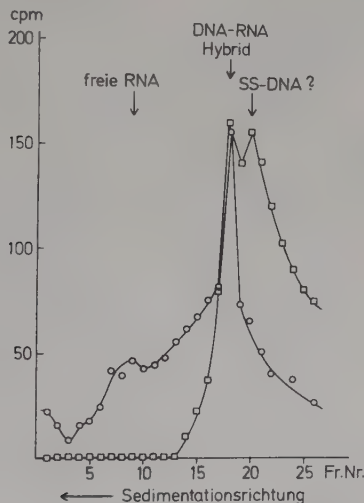
Modell der-synthetisierenden DNA-abhängigen RNA-Polymerase.

(Pfeil = Syntheserichtung)

Hayashi (70-72) konnte einen solchen RNA-DNA-Komplex isolieren. Allerdings fand er ihn nur an ϕ X 174 RF-I, für die man sich vorstellen kann, dass durch den "Supertwist" der DNA, die am Transcriptionsort über einige, höchstens 30 bis 50 Nukleotidreste an der DNA hybrid-gebundene RNA besonders stabilisiert.

Der Versuch der Charakterisierung der während der Synthese unter dem Enzym liegenden vor Nukleasen geschützten Nukleinsäurestrecken im Caesiumsulfat-Dichtegradienten (Gleichgewichtszentrifugation) ist in Abb.38) wiedergegeben (Isolierung siehe Material und Methoden).

Abb.38)



Charakterisierung der Enzymgeschützten Nukleotidreste im aktiven Synthesekomplex.

Caesiumsulfat-Gleichgewichtslauf ($d=1.55$): 60 Stunden bei 35000 Upm und 20°C. im Beckman SW.50.1-Rotor.
(Fraktion 1 = Boden des Gradienten).

Nach dem aufgestellten Modell sollten im Dichtegradienten sowohl DNA-RNA-Hybride als auch Einstrang-DNA-Stücke gefunden werden.

Hingegen ist in der Abbildung nur Material in der Position von Hybriden, nicht aber einsträngige DNA sichtbar.

Aus der Menge der Radioaktivität der Nuklease-geschützten Nukleinsäurestücke wurden 70 Desoxyribonukleotidreste und 27 Ribonukleotidreste pro Enzymmolekül errechnet, was eigentlich Hybride und DNA-Einzelstrang erwarten lässt.

Zur Erklärung der Theorie des Schmelzens scheinen physikalisch-chemische Methoden (UV-, IR-Spektroskopie, magnetische Kernresonanz) geeigneter.

Schon lange unbeantwortet ist die Frage, ob das synthetisierende Enzymmolekül monomer oder dimer ist.

Polymerase liegt in Lösung bei niedriger Ionenstärke ($\mu < 0.1$) in dimerer Form, bei hoher Ionenstärke ($\mu > 0.2$) in monomerer Form vor (26).

Aus Initiationskinetiken bei niedriger Ionenstärke, in denen durch γ -P32 ATP-Markierung Kettenzahlen bestimmt wurden, und den Proteinkonzentrationen, lässt sich errechnen, dass die monomere Form des Enzyms die aktive Transcriptionseinheit darstellen sollte (32, 73-75), was nicht ausschließt, dass für die Initiation die dimere Form eine Rolle spielen könnte.

Einen starken Hinweis für die monomere Form als aktive Transcriptionseinheit liefert die Sedimentationskonstante im niedrigen Salzgradienten. Der aus dem aktiven Komplex isolierte, Nuklease-geschützte Enzym-polynukleotidkomplex sedimentiert bei niedriger Ionenstärke mit ca. 14 S, es hat folglich die Fähigkeit verloren, bei NS zu dimerisieren.

III. Anhang

1. Eine neue Polyribonukleotidpyrophosphorylase (R.P.) aus E.coli.-----

In Nebenfraktionen der ρ - und κ -Aufarbeitung wurde ein Protein isoliert, das im Transcriptionsansatz stimulierende Aktivität zu zeigen scheint.

Bei näherer Analyse stellte sich heraus, dass diese Aktivität nicht auf einen Faktor zurückzuführen ist, der irgendeinen Schritt in der Transcription stimuliert, sondern von einem Protein verursacht wird, das eigene enzymatische Aktivität aufweist.

Es handelt sich um ein Enzym mit kleinem Molekulargewicht (20000 als Monomer, die native Form in 0.1 MKCl ist ein Dimer, siehe Material und Methoden).

Seine physikalischen und enzymatischen Eigenschaften sind denen der Polyribonukleotidpyrophosphorylase von Burma (80), der Polynukleotidphosphorylase (77) und der Poly-A-Polymerase (78,79) sehr verschieden.

Die Poly-A-Polymerase besitzt Untereinheiten, die alle ein wesentlich grösseres Molekulargewicht als das der neuen Polyribonukleotidpyrophosphorylase aufweisen (siehe Acrylamidelektrophorogramme von Terzi, 79).

Aktivität besitzt das Enzym nur in Gegenwart von RNA. (Tabelle 18), ein erster Hinweis für eine RNA-gestartete ("primed") Reaktion.

Tabelle 18:

-	T5-DNA	SS-T5-DNA	t-RNA
11	15	9	13685 cpm

Starterabhängigkeit von R.P.

R.P.-Standardansätze wurden mit 25 μ g der bezeichneten Starter 30 Minuten bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Da der Einbau an Waldhof-RNA (w-RNA), alkalisches Hydrolysat von Hefe-RNA, durchschnittliche Kettenlänge 20 bis 25 Ribonukleotidreste, verglichen mit t-RNA, sehr schlecht ist, wurde vermutet, dass der Starter freie 3'-OH-Enden besitzen muss. Der Beweis ist der Tabelle 19) zu entnehmen.

Tabelle 19:

a	b	c	d
w-RNA	w-RNA + PME (1 µg)	t-RNA	t-RNA (ox.)
5381	20366	11527	356 cpm

Endgruppeneigenschaften des Starters.

Jeweils 25µg w- und t-RNA (a,c) oder w-RNA, die mit Phosphomonoesterase und t-RNA, die mit Perjodat oxydiert wurde, waren im R.P.-Standardansatz 30 Minuten bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt worden.

Nach enzymatischer Behandlung von w-RNA mit Phosphomonoesterase (Entfernung der terminalen 2'- und 3'-Phosphatreste, enzymatische Herstellung von 3'-OH-Enden) steigt die enzymatische Aktivität, nach Oxydation der 3'-terminalen Nukleotidreste von t-RNA mit Perjodat (81) verschwindet die Starteraktivität.

ADP kann ATP im Inkubationsansatz nicht ersetzen. Durch Weglassen von PEP und PEPK, die die stationäre Konzentration von evtl. aus ATP entstehendem ADP sehr klein halten, kann die Enzymaktivität nicht erhöht werden. Dies bedeutet, dass das Enzym keine Polynukleotidphosphorylase ist.

Tabelle 20:

	Standardansatz	-PEP, PEPK	ADP
cpm	12230	12220	113

Test auf Polynukleotidphosphorylase-Aktivität.

R.P.-Standardansätze mit und ohne PEP und PEPK und mit ADP (0.3 C/M. C14) anstelle von ATP wurden 30 Minuten bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Das Enzym besitzt ein scharfes Syntheseeoptimum bezüglich der Magnesiumionen-Konzentration. Magnesiumionen sind absolut erforderlich. Einwertige Ionen wie Kalium beeinflussen die Reaktion nur unwesentlich (Abb.39).

Der optimale pH-Wert für den Einbau von AMP-Resten aus ATP, gemessen in Gegenwart aller Triphosphate, liegt bei 10, Abb.40.

Das pH-Optimum der Reaktion verschiebt sich, wenn einzelne Triphosphate angeboten werden, wie später noch aufgezeigt wird. Es liegt z.B. unter diesen Bedingungen für ATP und bestimmte Starter im pH-Bereich um 7, für UTP immer noch bei 10.

Das Enzym ist nicht sehr temperaturempfindlich. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt auch bei Temperaturen oberhalb 37°C., bis 45°C. zunächst noch linear weiter an, Abb.41.

Die Titrationskurve an t-RNA hat einen definierten Sättigungswert, der zeigt, dass eine wesentlich grössere Enzymmenge als die stöchiometrische benötigt wird. (42. Abb.)

Aus einer Laineweaver-Burke-Auftragung der Werte der Sättigungskurve ergibt sich ein K_M von $8 \cdot 10^{-5}$ für die Bindung von Enzym an t-RNA.

Die Kinetik der Reaktion mit t-RNA als Starter zeigt linearen Verlauf über Stunden (Abb.43).

Es wurden auch einige bekannte Hemmstoffe der Transcription im Synthesesystem eingesetzt (Tabelle 21).

Tabelle 21:

-	34915	Heparin (25 µg)	315
ADP	277	Proflavin (10 µg)	25322
EDTA(0.05 M)	17	Actinomycin (10 µg)	2120
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.5M)	3325	Rifampicin (10 µg)	33112

Tabelle 21: R.P.-Hemmstoffe.

R.P.-Standardansätze wurden 60 Minuten bei 37°C. mit den entsprechenden Hemmstoffen des Transcriptionssystems inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt. Die Angaben sind cpm.

Abb. 39)

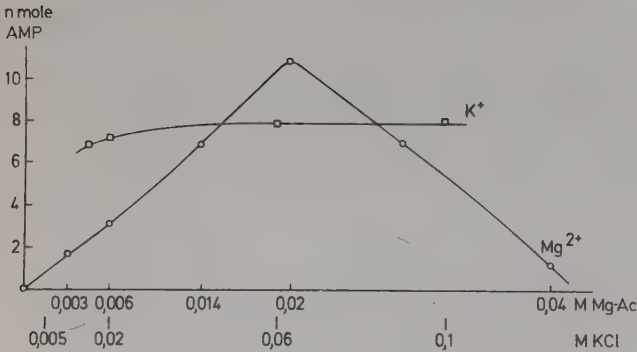
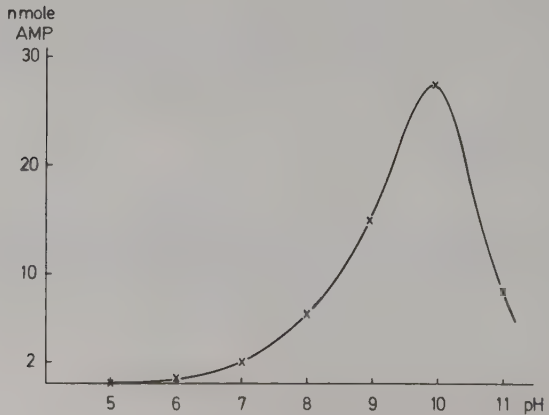


Abb. 40)



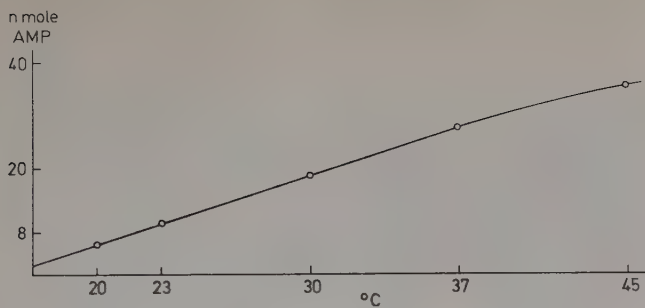


Abb. 41)

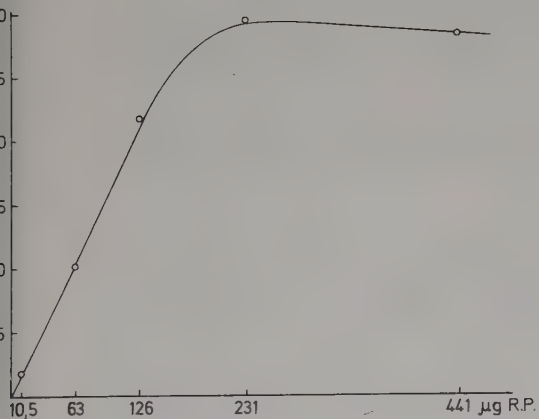


Abb. 42)

Abb. 43)

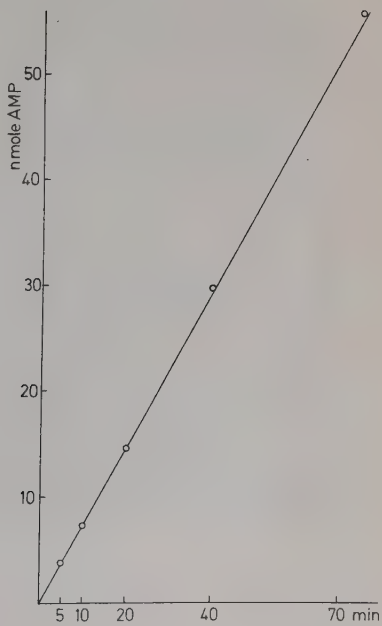


Abb.39: Salzabhängigkeit der Synthese von R.P.

R.P.-Standardansätze wurden unter verschiedenen Salzbedingungen 15 Minuten bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Abb40: pH-Abhängigkeit der Synthese von R.P.

R.P.-Standardansätze wurden bei verschiedenen pH 30 Minuten bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Abb.41: Temperaturabhängigkeit der Synthese von R.P.

R.P.-Standardansätze wurden 30 Minuten bei verschiedenen Temperaturen inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Abb.42: Sättigung von R.P. an t-RNA.

R.P.-Standardansätze wurden mit steigenden Mengen R.P. 15 Minuten bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Abb.43: Kinetik der Synthese mit R.P.

Aus einem vierfachen R.P.-Standardansatz wurden zu diversen Zeiten 0.2 ml Aliquote entnommen, TCA gefällt, filtriert und gezählt. Die Inkubationstemperatur betrug 37°C.

Ammoniumsulfat, Heparin, EDTA, ADP und Actinomycin hemmen den Einbau.

Actinomycin-Hemmung ist nicht ohne weiteres verständlich. Evtl. kommt sie dadurch zustande, dass die Bindung von Actinomycin an Guanosinreste des Starters die Bindung des Enzyms an diesem verhindert.

Heparin als Polyanion bindet wahrscheinlich an das Enzym, das relativ basisch ist (siehe Material und Methoden).

Da das Enzym zur Synthese Magnesiumionen braucht, ist die EDTA-Hemmung verständlich.

ADP als Substratanalogon hemmt vermutlich kompetitiv.

Ammoniumsulfat übt wahrscheinlich einen Ionenstärkeeffekt aus.

Proflavin hemmt die Synthese kaum, und Rifampicin hat überhaupt keinen Einfluss auf die Synthese.

Dies wurde benützt, um zu zeigen, dass das Enzym nicht nur der Anwesenheit von 3'-OH-Enden bedarf, sondern sein Produkt an diese anknüpft.

Mittels Transcriptionsansätzen wurde bei niedriger Ionenstärke mit unmarkierten Ribonukleosidtriphosphaten T4- und T7-spezifische m-RNA synthetisiert. Niedrige Ionenstärke wurde gewählt, um zu zeigen, dass unter diesen Bedingungen nach Erreichen des Plateaus der Synthese die RNA vom Polymerase-DNA-Komplex freigesetzt wird, sodass freie 3'-OH-Enden zur Verfügung stehen. Nach Zugabe von Rifampicin, zur völlig sicheren Blockierung weiterer Transcription; C14-ATP als markiertes Substrat und Polyribonukleotidpyrophosphorylase, wurde Polynukleotid-Synthese durch dieses Enzym weitere 30 Minuten lang zugelassen. Nun wurde diese RNA für Hybridisierungsexperimente nach Gillespie und Spiegelman (47) unter Vermeidung des RNAase-Schritts eingesetzt. Nach der auf dem Filter verbleibenden Aktivität (Tabelle 22) kann man eindeutig sagen, dass die neu synthetisierte RNA mit den T7- oder T4-Transcripten kovalent, evtl. über 3'-OH-Enden verknüpft wird.

Tabelle 22:

SS-DNA (5 µg/Filter)	T4-Transcripte (20 µg)	T7-Transcripte (20 µg)
T4	8639	880
T7	761	17005

R.P.-Produkt und Starter.

R.P.-Standardansätze, jedoch mit 20 µg T4- oder T7-Transcripte statt t-RNA, wurden 30 Minuten bei 37°C. inkubiert und über Cellulosenitratfilter filtriert.

Die RNA im Filtrat wurde durch Alkoholfällung (2.5 Vo. absol. Alkohol auf 1 Vol. RNA-Lösung) konzentriert und gegen zweimal-SSC dialysiert.

Danach wurde nach Gillespie und Spiegelman 6 Stunden bei 65°C. hybridisiert. Der RNAase-Schritt vor dem Zählen der Filter wurde weggelassen. Die Werte sind in cpm angegeben.

Hybridisierungsexperimente geben ebenfalls Auskunft, ob das Enzym an ein und demselben 3'-OH-Ende, an dem Synthese begonnen wurde, weiter synthetisiert oder ob es oszilliert.

Der Einfachheit halber lässt man das Enzym an T7-Transcripten und an t-RNA, die nicht an T5-DNA hybridisiert, arbeiten.

<u>Tabelle 23:</u>	1)	2)	
	Nettosynthese	Hybridisierbarkeit an T5-DNA	
T5-RNA	977	1074	a
t-RNA	852	53	b
T5-RNA + t-RNA	1273	591	c
Bindung 1. T5- 2. t-RNA	3036	687	d
Synthese 1. t-RNA 2. T5-RNA	1145	468	e
Bindung 1. t-RNA 2. T5-RNA	4071	566	f
Synthese 1. T5-RNA 2. t-RNA	1199	491	g

Synthese an zwei Startern.

R.P.-Standardansätze mit jeweils 25 µg Starter: T5-RNA, t-RNA und beide zusammen (a-c) wurden 10 Minuten bei 37°C. inkubiert. In den Ansätzen d) und f) wurde der erste Starter 5 Minuten lang bei 37°C. ohne Substrat und mit Substrat (e,g) vor Zugabe des zweiten Starter präinkubiert. Anschließend erfolgte Synthese für 10 Minuten bei 37°C. Die Ansätze wurden TCA gefällt, filtriert und gezählt (1). Parallel-Ansätze wurden zur Hybridisierung an T5-DNA, wie in Tabelle 22) beschrieben, angesetzt (2). Die Werte sind in cpm angegeben.

In allen Fällen, ob nach der Bindung oder während der Synthese baut das Enzym auch an dem Starter ein, der später zugegeben wurde, was besagt, dass es während der Synthese zwischen 3'-OH-Enden oszillieren kann.

Den Werten der Tabelle 23) kann man auch entnehmen, dass der Einbau nach längerer Präinkubation von Enzym und Starter nicht wesentlich erhöht wird.

Trotzdem lässt der dreimal so hohe Einbau im Falle der Präinkubation vermuten, dass das Enzym beim Erkennungsakt eine Konformationsänderung, jedenfalls einen Geschwindigkeits-bestimmenden Reaktionsschritt durchlaufen muss.

Die Ketten, die durch das Enzym am Starter synthetisiert werden, können Längen zwischen 2000 und 3000 Nukleotidreste erreichen. Die Berechnung wurde auf der Grundlage von Doppelmarkierungsexperimenten (γ -P32 pppA und H3-GTP) in einem gekoppelten Transcriptions-Polynukleotidpyrophosphorylase-System durchgeführt.

Der Starter muss eine gewisse Mindestlänge haben. Wird t-RNA mit panc. RNAase und PME (alkalische Phosphatase aus E.coli) zur Wiederherstellung freier 3'-OH-Enden an den gebildeten kleinen Oligonukleotiden verdaut, so kann das Enzym mit ATP keine Synthese mehr durchführen. ATP wurde gewählt, damit das daraus entstehende Produkt, poly A, nicht durch die noch anwesende Nuklease verdaut wird. Tabelle 24)

Tabelle 24:

a) t-RNA: 49097 cpm. b) t-RNA+RNAase+PME: 91 cpm.

Tabelle 24: Startergrösse.

Doppelte R.P.-Standardansätze, jedoch nur mit einem Substrat (C14 ATP, 0.3 C/M), wurden 30 Min. bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Bei Ansatz b) wurde vor Zugabe von R.P. die t-RNA 10 Minuten lang mit 10 µg RNAase und 1 µg Phosphomonoesterase (PME) behandelt.

Das Enzym arbeitet nicht reversibel. In Anwesenheit grosser Mengen von Pyrophosphat (nicht aber von Phosphat) im Ansatz tritt zwar starke Synthesehemmung ein, es erfolgt aber keine Pyrophosphorylyse des synthetisierten Produktes, Tabelle 25.

Tabelle 25:

a) Standardansatz	49097 cpm
b) RNA des Standardansatzes + 0.5 M Pyrophosphat	49649 cpm
c) Standardansatz + 0.1 M Pyrophosphat	9132 cpm
d) Standardansatz + 0.1 M Phosphat	48321 cpm

Einfluss von Phosphat und Pyrophosphat auf die Synthese.

Doppelte R.P.-Standardansätze mit Pyrophosphat und Phosphat (a, c, d) und durch das Enzym synthetisiertes und isoliertes Produkt (b) wurden 30 Minuten bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt.

Nun wurde das Enzym bei verschiedenen pH-Werten an diversen Startern mit den vier verschiedenen Ribonukleosidtriphosphaten auf Aktivität getestet (Tabelle 26).

Generell kann man sagen, dass der Einbau eines einzelnen Substrates in Anwesenheit aller anderen Triphosphate schlechter ist, als wenn nur eines im Syntheseansatz vorliegt.

GTP ist das schlechteste Substrat, ATP, abgesehen von einigen Startern (r-RNA, poly U, poly A, poly C) das beste.

Der Einbau von UTP ist bei allen Startern bei pH 10 wesentlich besser als bei pH 7. Der Einbau von ATP ist ungefähr bei beiden pH-Bereichen gleich gut.

Unter den getesteten natürlichen RNAs ist M12-RNA der beste Starter, für A- und C-Einbau.

Die Effizienz des Einbaues eines Triphosphates und das Verhältnis des Einbaues verschiedener Triphosphate sind also stark von den Startern abhängig.

Die pH-Abhängigkeit der Reaktion wird sowohl vom Starter als auch vom Substrat beeinflusst. Sie wird wahrscheinlich durch Dissoziationszustände (pK-Werte) der Basen im Starter und Substrat bestimmt.

Bestimmte Regeln lassen sich noch nicht erkennen.

Vielleicht ist die Reaktion auch von der Sekundärstruktur des Starters abhängig.

Unbekannt ist vorerst die Rolle dieses Enzyms wie auch der poly A-Polymerase im Zellgeschehen. Es ist durchaus denkbar, dass bei der Aufarbeitung Faktoren verloren gegangen sind, die dem Enzym andere Spezifitäten geben. Man kann sich auch vorstellen, dass das Anhängen langer poly A-Sequenzen an m-RNA diese vor Nukleasen in der Zelle schützt. Die Möglichkeit, dass dieses Enzym ein Teil der DNA-Polymerase ist, bleibt offen, obwohl der Einbau von Desoxyribonukleosidtriphosphaten, der interessanterweise an nativer DNA den grössten Wert erreicht, sehr gering ist.

Tabelle 26:

Markierte Triphosphate:A			U		G		C	
Starter:	pH 7	pH 10	pH7	pH10	pH 7	pH 10	pH 7	pH 10
r-RNA	0.078	0.066	0.037	0.027	0.042	0.017	0.191	0.109
w-RNA	12.057	12.11	0.398	7.198	0.036	0.025	1.205	0.402
Poly U	0.484	0.683	0.03	0.471	0.017	0.018	0.127	0.066
t-RNA	9.637	8.881	0.322	2.746	0.026	0.022	1.277	0.466
poly A	2.697	0.906	0.047	0.338	0.043	0.029	0.191	0.075
M ₁₂ RNA	39.59						1.889	
poly AU ⁺¹⁾	0.547	6.296	0.019	5.895	0.030	0.019	0.207	0.129
poly G ⁺²⁾	4.329	1.831	0.034	0.183	0.025	0.015	0.131	0.066
poly C ⁺³⁾	1.268	1.859	0.02	0.112	0.028	0.014	0.171	0.066
T4-RNA ⁺⁺	4.666	11.398	0.103	0.204	0.147	0.020	0.736	0.965
T5-RNA ⁺⁺	8.144	10.895	0.91	0.043	0.017	0.028	0.485	0.458
T7-RNA ⁺⁺	6.889	5.714	0.155	0.128	0.017	0.022	0.887	0.592
	pH 8		pH 8		pH 8		pH 8	
t-RNA	7.61		0.25		0.81		0.23	
t-RNA ⁺⁺⁺	1.21		0.05		0.19		0.11	

Tabelle 26: R.P.-Synthese an diversen Startern mit verschiedenen Substraten bei zwei verschiedenen pH-Werten.

R.P.-Standardansätze, bei pH 7 und pH 10 (ATP, UTP, GTP, CTP je 1 mM) wurden allein getestet, ATP und UTP (+1), GTP (+2), CTP (+3) und alle anderen Triphosphate waren in einer Konzentration von 0.1 mM (+1 bis +3, ++) und 1 mM (+++) anwesend.

Nach 30 Minuten Synthese bei 37°C. wurden die Ansätze TCA gefällt, filtriert und gezählt. Die Werte der Tabelle sind auf nMole umgerechnet worden.

2. Die Faktoren η und χ .

In diesem Kapitel werden diese beiden Faktoren nur kurz erwähnt.

η (Aufarbeitung siehe Material und Methoden) ist ein Partialkomplex von Polymerase, bestehend aus α und einem zweiten Protein, das praktisch das Molekulargewicht von β hat, allerdings etwas basischer als β ist.

Die Art der Hemmung der Transcription ist unbekannt. Vorstellungen, dass dieser Komplex evtl. an Promotoren der DNA bindet und somit für Polymerase die Initiation blockiert, oder dass er aufgrund seiner Basizität Faktor σ bindet, das dem Enzym zur Initiation dann nicht mehr zur Verfügung stehen würde, sind möglich.

Die Hemmung tritt nur bei niedriger und mittlerer Ionenstärke ein.

χ (Aufarbeitung siehe Material und Methoden) hemmt ebenfalls die Transcription und zwar nur bei niedriger Ionenstärke. Bei mittlerer Ionenstärke hat der Faktor eine stimulierende Aktivität, wobei nicht klar ist, ob diese durch eine Verunreinigung zustande kommt (Tabelle 27).

Tabelle 27:

	- χ	+ χ
NS	3130	1141
HS	4204	6982

Eigenschaften von χ bei niedriger und mittlerer Ionenstärke in der Transcription.

NS- und HS-T5-Standardansätze wurden mit und ohne sättigenden Mengen χ (80 μ g) 20 Minuten bei 37°C. inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt. Die Markierung erfolgte durch C14 ATP, 0.3 C/M. Die Werte sind in cpm angegeben.

Die Sättigungskurve (Abb.44) zeigt, dass die χ -Hemmung maximal bis zur Aktivität von Minimalenzym geht. Zur Hemmung benötigt man relativ grosse Mengen der χ -haltigen Proteinfraction. Dieses ist nicht erstaunlich, wenn man bedenkt, dass dieser Faktor noch stark mit anderen Proteinen verunreinigt ist. Die χ -Hemmung ist unabhängig von der DNA-Konzentration im Syntheseansatz.

Wird χ vor der RNA-Synthese mit DNA, Vollenzym oder σ präinkubiert, so tritt die stärkste Hemmung im Falle der Inkubation mit σ auf. Es scheint sich um einen Faktor zu handeln, der grosse Affinität zu σ hat. Die Hemmung der RNA-Synthese wäre auf den Entzug von σ zurückzuführen, das für die Initiation in der Transcription benötigt wird.

Einen weiteren Hinweis für den Antisigma-Charakter von χ erhält man bei Einsetzen von Enzym, verschiedenen σ -Sättigungsgrades (Abb.45).

Die Erhöhung der σ -Menge bei gleichbleibender Menge χ führt zur Reduktion der Hemmung. Die Hemmung mit steigenden Mengen χ ist für σ -ärmeres Enzym grösser als für solches, das mehr σ enthält.

Man kann sich vorstellen, dass in der Zelle ein derartiger Faktor grosse Bedeutung für regulative Zwecke haben kann.

Leider lässt die Reinheit von χ noch sehr zu wünschen übrig, sodass auf quantitative Aussagen an dieser Stelle verzichtet werden muss.

Abb.44)

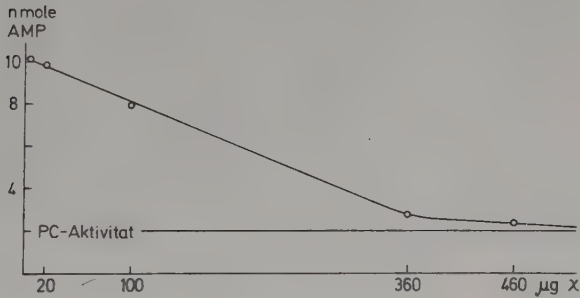


Abb.45)

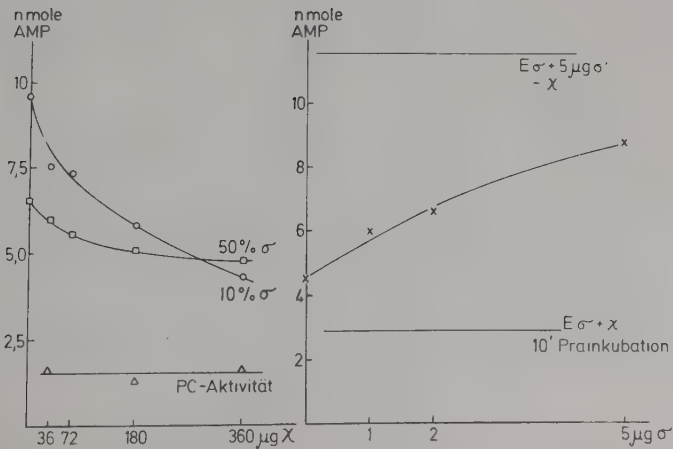


Abb.44: χ -Sättigung.

NS-T5-Standardansätze wurden 30 Minuten bei 37°C. mit steigenden Mengen χ inkubiert, TCA gefällt, filtriert und gezählt. Die Basislinie repräsentiert den Wert eines Standardansatzes ohne χ mit einer Enzymmenge, die zwar der Menge Enzym im Standardansatz entspricht, jedoch kein σ enthält.

Abb.45: Wirkungsweise des Faktors χ .

NS-T5-Standardansätze, Enzym enthaltend, das verschieden hoch mit Faktor σ gesättigt ist, wurden mit steigenden Mengen χ 30 Minuten bei 37°C. inkubiert (linke Zeichnung). NS-T5-Standardansätze wurden 20 Minuten bei 37°C. mit 360 μg χ und steigenden Mengen an zugesetztem inkubiert. Die Höhe der Basislinie ergibt sich aus dem Wert, der nach 10 Minuten Präinkubation von Enzym und χ vor der Synthese erhalten wird. Die obere Linie ist der Wert des Standardansatzes ohne χ , aber mit 5 μg zugesetztem σ , (rechte Zeichnung).

IV. Material und Methoden

1. Präparative Methoden

- a) Die Isolierung der Faktoren κ , ρ , χ und des Enzyms: Polynukleotidpyrophosphorylase.

Alle Schritte wurden bei 0°C. durchgeführt.

2 kg Zellen (Feuchtmasse, E.coli B, E.coli MRE 600 für Faktor ρ) werden im gleichen Volumen TMA-Puffer + 0.2 M. KCl unter Zusatz von ca. 50 ml Silicon-Antischaum suspendiert und im Durchfluss unter Schütteln mit Glasperlen (0.15 mm ϕ) bei 100 Hz in einer Zelmühle (82) homogenisiert. Der Rohextrakt wurde mit DNAase (5 μ g/ml) für 15 Minuten versetzt. Die Debris des Homogenates wurde durch Abzentrifugieren (30 Minuten, 19 000 Upm) im Rotor R 19 einer präparativen Ultrazentrifuge von Beckman entfernt. Die Proteine des Ueberstandes wurden mit 334 g/l Ammoniumsulfat gefällt (Abtrennung der Ribosomen). Die Ribosomen wurden manchmal auch durch Zentrifugation (3.5 Stunden bei 30 000 Upm im Rotor 30 von Beckman) des niedertourigen Ueberstandes entfernt. Der Niederschlag des Ammoniumsulfat-Präzipitates wurde durch Zentrifugation gesammelt, in 0.025 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7.5) gelöst und extensiv gegen diesen Puffer dialysiert. Diese Fraktion wurde über eine Phosphorylcellulosesäule mit einem linearen Gradienten (2 x 600 ml) von 0.05 M bis 0.5 M Phosphat chromatographiert. R.P. und κ eluierten bei ca. 0.5 M, χ bei 0.3 M, ρ bei ca. 0.16 M Phosphat. Die Proteine der Fraktionen wurden jeweils mit 371 g/l Ammoniumsulfat gefällt, durch Zentrifugation gesammelt, wieder gelöst und gegen 0.01 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7.5) dialysiert. Anschliessend wurden sie einzeln mit einem linearen Gradienten (2 x 50 ml) von 0.02 M bis 0.2 M Phosphat über eine 25 ml DEAE-Cellulosesäule chromatographiert. Gipfelfraktionen um 0.1 M Phosphat (ρ und χ), 0.2 M Phosphat (κ) und 0.06 M Phosphat (R.P.) wurden mit 371 g/l Ammonium-

sulfat versetzt. Die gesammelten Fällungen wurden in kleinem Volumen TMA-Puffer aufgenommen. 50 mg R.P., 170 mg κ , 40 mg χ und 50 mg ρ wurden an dieser Stelle erhalten. Die Reinheit betrug ca. 40-50%. Faktor χ ist noch stark verunreinigt. Die Proteine wurden auf einen linearen Gradienten (10-30% Sucrose, 5-10% Glycerin in TMA + 0.5 M Ammoniumchlorid für R.P., + 0.1 M Kaliumchlorid für ρ + 0.2 M Kaliumchlorid für κ) geschichtet und 20 Stunden bei 50 000 Upm im S.W.50.1-Rotor einer präparativen Ultrazentrifuge von Beckman sedimentiert. ρ -sedimentierte mit ca. 7-8 S, R.P. mit 2-3S und κ bei niedriger Ionenstärke (TMA) mit 4 S, bei hoher Ionenstärke (TMA + 0.2 M KCl) mit 6 S, was anzeigt, dass κ bei hoher Ionenstärke Oligomere bildet. Kleinere Verunreinigungen wurden durch mikropräparative Elektrophorese auf Cellulose-Acetat-Streifen (Cellogel) in Neutralpuffer unter Rückgewinnung des gereinigten Proteins (83) entfernt. κ , R.P. und ρ zeigen je eine einheitliche Bande in der Polyacrylamidgelelektrophorese und in der Cellogelelektrophorese (Borat-Puffer) . Abb.46-48.

Die Faktoren ρ und χ haben in der Cellogelelektrophorese (Borat-Harnstoff-Puffer) die gleiche Beweglichkeit wie die Untereinheit β' der Polymerase aus E.coli.

Die Molekulargewichte der Polypeptidketten von R.P. und κ werden aus den SDS-Gelen zu 20 000 bzw. 17 000 bestimmt. Faktor κ zeigt die gleiche Beweglichkeit in der Cellogelelektrophorese wie die Untereinheit β von E.coli-Polymerase. R.P. migriert zwischen den Untereinheiten β' und β . Verglichen mit den Untereinheiten der E.coli-Polymerase kann man sagen, dass alle neu isolierten Proteine relativ basisch sind.

Die Molekulargewichte der nativen Proteine wurden in einer Beckman analytischen Ultrazentrifuge, ausgerüstet mit einem Scanner, durch Sedimentation und Gleichgewichtszentrifuga-

tion in einer Sechskanalzelle (84) ermittelt.

Abb. 46

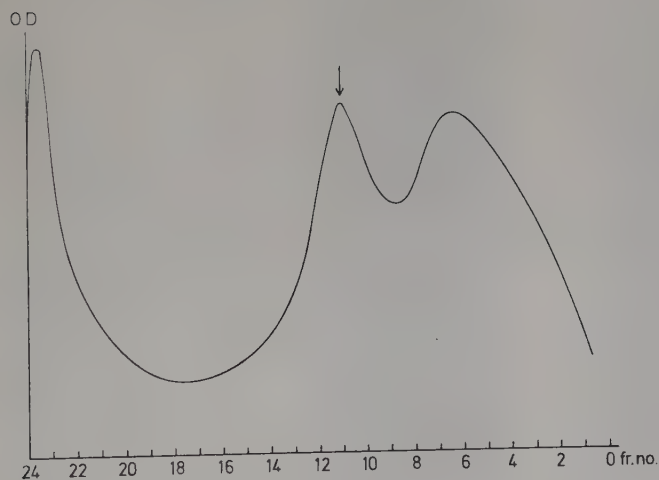


Abb. 47

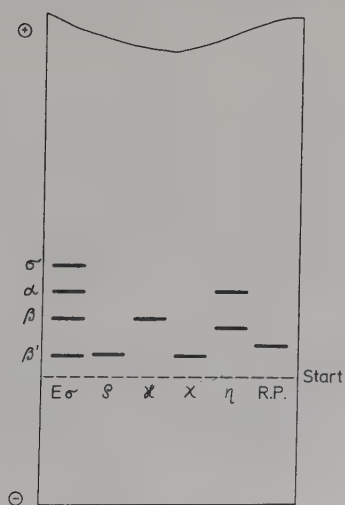




Abb.48

Abb.46: Reinigung des Faktors κ durch Sucrosegradienten-Zentrifugation.

5 mg der DEAE-Fraktion wurden in einem NS-Sucrosegradienten 20 Stunden bei 50 000 Upm im S.W.50.1-Rotor von Beckman sedimentiert.

5 μ l -Proben des fraktionierten Gradienten wurden auf die Depression der RNA-Synthese getestet. Der Pfeil auf der Abbildung bezeichnet den Gipfel der maximalen κ -Aktivität. (Fraktion 24=Boden v. Gradient).

Abb.47: Cellogelelektrophorese der Faktoren κ , ρ , η , χ und der Polyribonukleotidpyrophosphorylase.

Als Referenz diente Vollenzym. Die Laufzeit der Elektrophorese in Borat-Harnstoff-Puffer betrug 90 Minuten bei 1000 Volt.

Abb.48: Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Gele) von Faktor κ (20% Gel, a) und R.P. (10% Gel, b).

Als Referenzproteine für κ dienten die Untereinheit α von E.coli Polymerase und Cytochrom C, für R.P. alle Untereinheiten der E.coli-Polymerase.

R.P. sedimentiert in TMA + 0.2 M Ammoniumchlorid mit $s_{20,w}^0 \approx 3.1 \pm 0.3$ S. Das Molekulargewicht (Gleichgewichtszentrifugation) beträgt $40\,000 \pm 5\,000$.

κ sedimentiert in TMA + 0.1 M KCl mit $s_{20,w}^0 \approx 3.5 \pm 0.2$ S. Durch Gleichgewichtszentrifugation errechnet sich ein Molekulargewicht von $34\,000 \pm 5\,000$. Beide, κ und R.P. sind also unter diesen Bedingungen Dimere.

R.P., κ , ρ und χ können auch während der RNA-Polymerase-Aufarbeitung (11) isoliert werden.

Die Elution mit 0.7 M Ammoniumchlorid in TMA des Polymin P-Sedimentes enthält κ , ρ und χ , die anschließende Elution mit 0.9 M Ammoniumchlorid enthält, abgesehen von Polymerase, die Polyribonukleotidpyrophosphorylase. Diese Elutionen werden wie oben beschrieben mit Ammoniumsulfat gefällt, dialysiert und über eine PC-Säule etc. chromatographiert.

b) Die Isolierung des Faktors η .

Der Faktor η ist Bestandteil der 40%igen Ammoniumsulfat-Fällung des RNA-Polymerase-haltigen Eluates der DEAE-Säule (11, Aufarbeitung von RNA-Polymerase aus 2 kg Bakterien-Feuchtmasse). Diese Fällung wird in TMA-Puffer gelöst und in einem HS-Sucrosegradienten 8 Stunden bei $50\,000$ Upm im S.W.50.1-Rotor von Beckman sedimentiert.

Die Gipfelfraktion, die mit ca. 12-15 S sedimentiert, zeigt bei niedriger und mittlerer Ionenstärke, nicht aber bei hoher Ionenstärke, im Transcriptionsansatz eine deutliche Hemmung der RNA-Synthese.

Diese Fraktion wurde mit 374 g/l Ammoniumsulfat gefällt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation gesammelt, in 0.025 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7.5) gelöst und extensiv gegen diesen Puffer dialysiert. Anschliessend wurde diese Fraktion über eine 200 ml Phosphorylcellulosesäule mit einem linearen Gradienten (2x250 ml) von 0.05 bis 0.5 M Kaliumphosphat (pH 7.5) chromatographiert.

η eluierte bei ca. 0.25 M Phosphat.

Der Faktor besteht im wesentlichen aus zwei Untereinheiten, die die gleichen Molekulargewichte der Untereinheiten α und β der RNA-Polymerase haben (Polyacrylamidelektrophorese in SDS).

In der Cellogelelektrophorese (Borat-Harnstoff-Puffer) hat eine Untereinheit von η die Beweglichkeit von α , die andere eine Beweglichkeit, die etwas geringer als die von β ist (Abb.48).

c) Eine neue Mikro-Präparation von hochgereinigten S-35- und C-14-markierten RNA-Polymerasen.

Das Verfahren ohne grosses Risiko einer radioaktiven Verseuchung ist schnell und einfach für die Isolierung markierter, nativer RNA-Polymerasen.

Das Verfahren geht von kleinen Mengen an E.coli-Zellen aus, die in Anwesenheit geeigneter radioaktiver Vorstufen gezüchtet wurden und ergibt in sehr guter Ausbeute reine Enzyme mit hoher enzymatischer und radioaktiver spezifischer Aktivität.

Die zwei verschieden markierten Transkriptasen wurden nach der gleichen Methode präpariert, wie durch eine frühere Aufarbeitung beschrieben.(11)

Die Bakterien wuchsen bei 37°C. unter starker Belüftung in S-Medium und C-Medium.

S-Medium: 2.5×10^{-2} M Glucose, 3×10^{-2} M Na_2HPO_4 ,
 1.5×10^{-5} M SO_4^{2-} , 2×10^{-2} M NH_4Cl ,
 2×10^{-2} M KH_2PO_4 , 10^{-2} M NaCl , 5×10^{-4} M
 CaCl_2 , 5×10^{-3} M MgCl_2 .

C-Medium: wie S-Medium, statt 1.5×10^{-5} MSO_4^{2-} und
 5×10^{-3} M MgCl_2 , 5×10^{-3} M MgSO_4 .

Radioaktives Material:

C14-Proteinhydrolysat (50 C/g-Atom C),
(S35)- K_2SO_4 (100 C/M).

S35-markierte Bakterien:

E.coli-B-Zellen wuchsen in 100 ml S-Medien. Die Sulfatkonzentration reichte für das logarithmische Wachstum bis zu einem Zelltitert von 1.5×10^9 Zellen /ml aus.

Die Bakterien wurden geerntet durch schnelles Kühlen auf 0°C . bei einem Zelltitert von 7.5×10^8 Zellen/ml. Die Hälfte der Markierung wurde in die Zellen inkorporiert. Ca. 0.2 g Zellen wurden erhalten.

C14-markierte Bakterien:

E.coli-B-Zellen wuchsen in einem Liter C-Medium bis zu einem Titer von 10^9 Zellen/ml. Ungefähr 2 g Zellen wurden geerntet.

2 g markierter Zellen wurden in 2 ml TMA-Puffer suspendiert. Sie wurden anschliessend in einem 10 ml-Becher, gefüllt mit Glasperlen, in einer Zelmühle homogenisiert. Vor der Homogenisierung wurden einige Tropfen Silicon-Antischaum der Suspension hinzugefügt.

Die Glasperlen wurden nach der Homogenisierung mittels einer Glasfilterfritte abgetrennt und zweimal mit je 2 ml TMA-Puffer gewaschen.

Die Filtrate wurden direkt in einem Zentrifugen-Röhrchen gesammelt. Nachdem 8 mg Vollenzym aus E.coli dem Homogenat zugefügt wurden, addierte man 2 ml Polymin P-Lösung. (Durch starkes Rühren wurde der anfänglich gelatinöse Niederschlag in ein weisses, flockiges Material umgewandelt.)

Die Sedimente wurden durch Zentrifugation 30 Minuten nach der Fällung gesammelt. (Sorvall RC-2B-Zentrifuge, SE 12-Rotor, 5 Minuten bei 20 000 Upm.)

Der Ueberstand wurde verworfen, und das Sediment wurde 3 x mit je 6 ml TMA-Puffer + 0.7 M Ammoniumchlorid gewaschen. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde das Sediment im Zentrifugen-Röhrchen mit Hilfe eines POTTER-Homogenisators resuspendiert.

Anschliessend wurde dieses gewaschene Sediment dreimal mit TMA-Puffer + 1.2 M Ammoniumchlorid eluiert. Diese Prozedur erfolgte in der gleichen Weise wie die oben beschriebenen Wasche.

Die vereinigten Protein-Eluate wurden mit festem Ammoniumsulfat (334 g/l Lösung) gefällt. Die Fällung wurde eine Stunde stehengelassen. Der Niederschlag wurde durch Sedimentation gesammelt (10 Minuten, 20 000 Upm.).

Der Ueberstand wurde verworfen, und Rückstände der Ammoniumsulfat-Lösung am Zentrifugen-Röhrchen wurden vollständig entfernt.

Das Zentrifugat wurde in 0.5 ml TMA-Puffer gelöst. Anschliessend wurde die Lösung mit 5 ml Wasser versetzt und über eine DEAE-Cellulose-Kolonne (5 x 70 mm) mit einer Durchflussrate von 2ml pro Stunde chromatographiert.

Die DEAE-Cellulose wurde vorher gegen TMA äquiliibriert.

Nachdem das Protein aufgetragen war, wurde die Säule mit 3 ml TMA-Puffer + 0.1 M Ammoniumchlorid gewaschen, anschliessend das Enzym mit TMA-Puffer + 0.3 M Ammoniumchlorid eluiert. Das opaleszente Eluat wurde bis 40% Ammoniumsulfat gesättigt.

Nach 30 Minuten wurde der Niederschlag durch Zentrifugation entfernt. Der Ueberstand wurde auf 50% Ammoniumsulfat-Sättigung gebracht. Eine Stunde später wurde der Niederschlag sedimentiert, der Ueberstand verworfen, und das Sediment in 0.2 ml TMA-Puffer gelöst.

Diese Lösung wurde auf einen NS-Sucrosegradienten geschichtet und 4 Stunden bei 50 000 Upm im Rotor S.W.50.1 in einer Beckman Ultrazentrifuge sedimentiert.

Ca. 20 Fraktionen wurden gesammelt, und jeweils 2 µl jeder Fraktion wurden auf einen Celluloseacetat-Streifen pipetiert. Nachdem das Protein auf dem Streifen eingetrocknet war, wurde es gefärbt (83). Die Position der RNA-Polymerase war direkt sichtbar, denn das meiste Protein, das auf den Gradienten geschichtet wurde, bestand aus Enzym, das zum Homogenat zu Beginn der Reinigungsschritte addiert wurde.

Die Gipfelfraktionen wurden vereinigt und durch Sättigung der Lösung mit 55% Ammoniumsulfat gefällt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation gesammelt und in 0.2 ml TMA-Puffer gelöst. Diese Lösung wurde auf einen zweiten Sucrosegradienten geschichtet, der ausser der niedrigen Ionenstärke additive 0.5 M Ammoniumchlorid enthielt. Nach achtstündiger Zentrifugation bei 50 000 Upm wurden die Fraktionen gesammelt und in der gleichen Weise getestet wie oben beschrieben. Die Gipfelfraktionen wurden vereinigt, und das

Enzym wurde konzentriert durch Fällung mit Ammonium-sulfat. Der Niederschlag wurde in 0.1 ml TMA-Puffer gelöst und mit weiteren 0.1 ml Glycerin versehen, damit es schadenfrei bei -20°C . gelagert werden kann.

Die spezifischen Aktivitäten der beiden Enzyme betrugen unmittelbar nach der kompletten Isolierungsprozedur (3 Tage):

C14: 2500 dpm/ μg Enzym

S35: 225000dpm/ μg Enzym

Normalenzym wurde in grossen Mengen nach der Methode von Zillig et al (11) isoliert.

d) Züchtung von Bakterien (E.coli MRE 600).

Damit der Test auf transcriptions-blockierende Faktoren nicht durch anwesende RNAase I gestört wird, ist der E.coli-Stamm, der RNAase I⁻ ist, geeignet zur Aufarbeitung der beschriebenen Transcriptions-Blockierungs-Faktoren.

In 100 l-Edelstahlbehälter wurden die Zellen unter kräftiger Belüftung bei 37°C . in "Supermedium" gezogen. Bei einem Titer von 2×10^{10} Zellen/ml wurde durch Zugabe von Eis rasch auf 0°C . abgekühlt und in einer kontinuierlichen Zentrifuge (Padberg) bei 40 000 Upm abzentrifugiert.

Die Ausbeute betrug 1.2 kg Zellen. Die Zellen wurden als feste Paste bei -60°C . eingefroren und aufbewahrt.

Supermedium: 5% Pepton, 2% Hefe-Extrakt, 0.5% NaCl,
4% Silicon-Antischaum, pH 7.0(NaOH)

- e) Zucht und Reinigung der Bakteriophagen T4, T5 und T7.
T5 auch mit H3-markierter DNA).

In 15 Liter-Zuchtflaschen mit Belüftung wurden die entsprechenden Wirts-Bakterien (E.coli B für T4- T5- und T7-DNA, E.coli 159 F⁺ Thy⁻ für H3-markierte T5-DNA) in einem Medium nach Fraser und Jerrel (85), angereichert mit 5% Glucose und 1% Pepton (das Medium für den Bakterienstamm 159 F⁺ Thy⁻ enthielt statt dem Pepton 5 µg/ml Thymidin), bis zu einer Zelldichte von ca. 5×10^8 Zellen/ml bei 37°C. gezogen und mit Phagen mit einer M.O.I. von 10 infiziert (im Falle von T5-Phagen wurde mit der Infektion das Medium mit einer Konzentration an 0.1 M CaCl₂ versehen. Im Falle von H3-markierten Phagen - T5-DNA - wurde bei der Infektion zusätzlich noch 1 mC Thymidin addiert.) und 2 bis 3 Stunden weiter inkubiert. Anschliessend wurden die Lysate mit einigen ml Chloroform versetzt und auf 0°C. abgekühlt. Zellen und Zelltrümmer wurden durch Filtration der Lysate durch eine 1-2 cm dicke Schicht von Kieselgur abgetrennt und die Phagen entweder durch Zentrifugation für 1 Stunde bei 19 000 Upm im Rotor Typ 19 einer Spinco-L 2 50 B-Ultrazentrifuge von Beckman sedimentiert, oder durch Zusatz von 0.1 M Natriumchlorid und PEG 6000 (10%) gefällt, und die Fällung nach 1 Stunde niedertourig abzentrifugiert.

Nach vorsichtigem Lösen der Sedimente in TMA-Puffer wurden die reinen Phagen durch Zentrifugieren in einem Caesiumchlorid-Stufengradienten (86), Fraktionieren und anschliessendes Entfernen des Caesiumchlorides durch Dialyse gegen TMA-Puffer gewonnen (für T5-Phagen muss im TMA-Puffer zusätzlich 10^{-3} M CaCl₂ anwesend sein.)

f) Isolierung der Phagen-DNA.

In Lösungen von gereinigten Phagen wurde die DNA durch fünfmaliges Ausschütteln mit einem gleichen Volumen puffer-gesättigten Phenols (0.01 M Tris-Acetat pH 7.9, 0.001 M EDTA, 0.08% Oxychinolin), gefolgt von viermaligem Ausschütteln mit einem Gemisch Chloroform-Octanol = 9:1 und danach viermal mit Chloroform allein, vom Protein befreit. Reste von Chloroform wurden durch extensive Dialyse der DNA-Lösungen gegen 0.01 M Tris-Acetat pH 7.9, 0.001 M EDTA bei 4°C. entfernt. Die Lösungen wurden normalerweise auf eine Konzentration von 1 mg/ml DNA eingestellt.

g) Isolierung des aktiven Komplexes.

100fache NS-T5-Standardansätze und zehnfache HS-T5-Standardansätze, jedoch mit der zehnfachen Konzentration an Enzym, wurden 60 Minuten inkubiert (das markierte Substrat war ATP, α -P32 1 C/M, die DNA war H3-markiert).

Anschliessend wurde die Lösung auf einen Gradienten (NS-Sucrose) geschichtet, und der Komplex wurde 2 Stunden bei 60 000 Upm und 0°C. von den Triphosphaten durch Sedimentation befreit.

Der pelletierte DNA-RNA-Enzym-Synthese-Komplex wurde für 1 Stunde bei 37°C, mit je 50 μ g RNAase und DNAase versetzt. Zur Isolierung der Enzymfraktion mit den darunter geschützten Nukleotidresten wurde die Lösung in Neutral-Puffer auf präparativen Cello-gel-Streifen elektrophoretisiert (Abtrennung der durch den Abbau freigewordenen Nukleotidresten, Abtrennung der DNAase und RNAase von der Enzymfraktion). Die Enzymfraktion wurde wie in 83 beschrieben isoliert.

2. Quantitative Bestimmungsmethoden.

a) DNA: Die DNA-Konzentration wurde nach den Methoden von Dische (87) und Burton (88) bestimmt.

b) RNA: Die RNA-Konzentration wurde nach der Methode von Orcin (89) gemessen.

c) Protein: Die Protein-Konzentrationen wurden nach Lowry et al (90) bestimmt. Für sehr kleine Protein-Konzentrationen wurde die Methode von Heil und Zillig (83) verwendet.

d) Extinktionsbestimmungen: Im UV- und sichtbaren Bereich wurden die Extinktionen mit einem Zeiss-Spektrophotometer PM Q II ausgeführt.

e) Impulsratenmessungen: Impulsraten wurden in einem Packard TriCarb Flüssigkeits-scintillations-Spektrometer Modell 3380 gemessen. Die Scintillations-Flüssigkeiten bestehen entweder aus Toluol oder Dioxan:

1. Toluol-Scintillator: 9 g PPO, 1.125 g POPOP,
1 l Toluol.

2. Dioxan-(Bray-)Scintillator:

4 g PPO, 0.2 g POPOP,
60 g Naphthalin, 100 ml Methanol,
20 ml Äthylenglycol, Dioxan
ad 1 Liter.

f) RNA-Synthese:

Netto-Synthese: niedrige Ionenstärke:

0.006 M Mg-Acetat
0.05 M NH_4Cl
0.03 M Tris-Acetat, pH 7.9

mittlere Ionenstärke:

0.03 M Mg-Acetat
0.12 M NH_4Cl
0.03 M Tris-Acetat, pH 7.9

hohe Ionenstärke:

0.07 M Mg-Acetat

0.13 M NH_4Cl

0.03 M Tris-Acetat, pH 7.9

Ausser den angeführten Salzen enthalten die Standardansätze folgende Komponenten:

5 μg PEP-Kinase

0.25 mg PEP

ATP, GTP, CTP, UTP (1 mM)

ATP wurde mit einer spez. Aktivität von 0.1 bis 1 C/M (Cl_4) oder 2-10 C/M (H_3) eingesetzt. Für Kettenbestimmungen und Initiations-Kinetiken wurde γ -P32 ATP (100-1000 C/M) eingesetzt.

In Doppelmarkierungsexperimenten (mit H_3 -DNA) wurde die RNA durch α -P32 ATP markiert.

Bei den Experimenten, in denen die RNA-Synthese durch Pyrophosphatakkumulation gemessen wurde, setzte man γ -P32 ATP ein.

Die Standardansätze:

NS, MS, HS: Ansätze mit den oben angegebenen Ionenstärken.

T5: 25 μg T5-DNA
5 μg Enzym

T4: 18 μg T4-DNA
1 μg Enzym

T7: 50 μg T7-DNA
1 μg Enzym
20 μg BSA

R.P.: 25 μg t-RNA, ATP 0.3 C/M
13 μg R.P., AUGC-TP 1 mM
0.02 M Mg-Acetat
0.12 M Ammoniumchlorid
0.05 M Glycin-KOH, pH 10

Ausser R.P. sind alle fehlenden Substanzen der Ansätze oben angegeben.

Die Zählvorbereitung der Inkubationsansätze:

RNA-Synthese:

Nach der Inkubationszeit wurde die Synthese durch Zugabe von 2 ml Eiswasser gestoppt, säureunlösliche Substanzen - unter ihnen die neu synthetisierte RNA - mit 2 ml 10%iger TCA gefällt und durch Cellulosenitrat-Membranfilter von 0.45 μ Porengrösse (Sartorius-Membranfilter) abgesaugt. Mindestens 3-4 maliges Nachwaschen mit 5%iger TCA entfernte

überschüssiges, markiertes Substrat. Nach dem Trocknen (10 Minuten), 80-90°C., wird die Radioaktivität auf den Filterchen gemessen.

Synthetisierte Kettenanfänge (Initiationskinetiken):

Da für diese Technik sehr hoch markiertes (100 bis 1000 C/M) Substrat eingesetzt wurde, musste ein sehr hoher "background" von den Filterchen entfernt werden.

Die Proben wurden mit 10%iger TCA + 0.1 M Pyrophosphat gefällt und filtriert wie oben beschrieben. Nach dieser Filtration wurden die Filterchen in eine Absaugvorrichtung transferiert, die es gestattet, den Durchmesser der Filterchen restlos zu waschen. Die Kaminaufsätze der Absaugfritten nehmen ein totales Waschvolumen an Puffer von 0.2 Liter auf. Jedes Filterchen wurde portionsweise 3 mal mit 0.2 Liter TCA-Pyrophosphat gewaschen. Danach ergab sich ein "background" von 20 cpm pro Filterchen.

RNA-Synthese, gemessen durch Pyrophosphat-Akkumulation:

Diese Technik ist von Krakow (43) beschrieben.

3. Analytische Methoden.

a) Die Cellogel-Elektrophorese: (83)

Celluloseacetat-Folien, 17 x 4 cm, wurden zum Aequilibrieren zweimal 5 Minuten mit jeweils neuem Elektrophoresepuffer geschüttelt. Die Streifen wurden in einer feuchten Kammer auf eine gekühlte Messingplatte mit einem Teflon-Ueberzug gelegt und mit Löschpapier getrocknet. Die Substanz wurde mittels einer Polyäthylenkapillare aufgetragen. Nach Anlegen von zwei puffergetränkten Papierfilterstreifen zwecks Stromzuführung lief die Elektrophorese für ca. 1-2 Stunden. Bei analytischen Streifen wurden max. 25 W. pro Streifen zugelassen. Nach der Elektrophorese wurden die Streifen 5 Minuten in einer

Lösung von 0.25% Amidoschwarz 10B in Methanol-Eisessig-Wasser = 50:10:40 angefärbt und anschliessend mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch entfärbt. Das Protein behält dabei seine Färbung.

b) Die Polyacrylamid-Elektrophorese:

Die Polyacrylamidgele für Proteinläufe wurden nach der Anleitung von Lämmli (91), die für RNA-Läufe nach der Anleitung von Schärrer (92) aufbereitet.

4. Spezielle Methoden.

a) Die Hybridisierung und die Hybridisierungs-Kompetition:
Die Technik wurde nach Gillespie und Spiegelman (47) durchgeführt.

Auf den Filterchen aus Cellulosenitrat wurden jeweils 5 µg SS-DNA immobilisiert.

Die Aufarbeitung der spezifischen RNAs war folgende:
100fache NS-Standardansätze, 10fache HS-Standardansätze, mit und ohne sättigenden Mengen der Faktoren wurden 45 Minuten bei 37°C. inkubiert. Die Markierung der RNA erfolgte durch C14 ATP (1C/M). Nach der Inkubationsperiode wurden die Ansätze bei 100°C. für 15 Minuten weiterinkubiert (Denaturierung des Proteins, Schmelzen der DNA).

Anschliessend wurden die Ansätze in Portionen (zur Vermeidung einer Uebersättigung der Cellulosenitratfilter) filtriert (Entfernung des denaturierten Proteins, Zurückhaltung der einsträngigen DNA).

Die RNA im Filtrat wurde mit absolutem Alkohol über Nacht bei -20°C. gefällt (2.5 Vol.absol.Alkohol auf 1 Vol.wässr.RNA-Lösung). Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation gesammelt und in zweimal SSC-Puffer aufgenommen und extensiv gegen denselben Puffer dialysiert. (Entfernung der durch den Alkohol mitgefällten Triphosphate)

Die RNA-Konzentration wurde nach Orcin (89) bestimmt. Diese Lösungen wurden direkt zur Hybridisierung eingesetzt.

b) Die Filtration nativer Synthese-Komplexe:

Hier wurde die Technik von Jones und Berg (48) angewandt.

c) Syntheseansätze in Anwesenheit von Heparin:

Siehe Dissertation von K.Zechel (93).

d) Formylierung der RNA:

In Gradienten ist es äusserst wichtig, dass die RNA nicht in aggregierter Form vorliegt. Zur Vermeidung der Aggregatbildung wurde die RNA nach Richardson (45) mit Formaldehyd umgesetzt.

e) Endgruppenoxydation von t-RNA:

Die endständigen Zuckerreste von t-RNA wurden mit Perjodat nach RajBhandary (81) oxydiert.

5. Lösungen.

a) Sucrosegredienten:

NS-, HS-Gradienten: Ionenstärke, siehe Material und Methoden (2. f). Die linearen Sucrosegredienten wurden mittels einer geeigneten Mischapparatur präformiert. Die Lösungen dazu enthielten ausser den Salzen zur Ionenstärke:

- | | |
|----------------------|----------------------|
| 1. 10% Sucrose (w/v) | 2. 30% Sucrose (w/v) |
| 5% Glycerin (v/v) | 10% Glycerin (v/v) |

Formylierte RNA wurde in den Sucrosegredienten mit den gleichen, obenangeführten Substanzen, sedimentiert, jedoch enthielten die Gradienten zusätzlich eine entsprechende Menge Formaldehyd (45).

b) TMA-Puffer:

0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.022 M NH_4Cl , 0.01 M
2-Mercaptoäthanol, 0.01 M Mg-Acetat.

c) Cellogel-Puffer:

Borat-Harnstoff-Puffer: 0.6 M Borat, 6 M Harnstoff,
pH 9.0 (NH_4OH), 0.01 M EDTA,

Neutral-Puffer: 0.5 M Tris-Acetat, pH 7.9
0.01 M Mg-Acetat, 0.001 M EDTA,
0.01 M 2-Mercaptoäthanol,

d) Hybridisierungs-Puffer:

zweimal SSC

1 x SSC: 0.15 M NaCl, pH 7

0.015 M Natriumcitrat.

6. Bezugssquellen:

DEAE-Cellulose	Fa.Serva, Heidelberg
Phosphorylcellulose	Fa. Whatman/Hormuth & Vetter,
Ribonuklease	Fa.Serva, Heidelberg
Desoxyribonuklease	Worthington, Boehringer
Pyruvatkinase	Boehringer, Mannheim
Phosphoenolpyruvat	-"-
Triphosphate, unmarkiert	Pabst Lab., Milwaukee, Wisc.
Triphosphate, radioaktiv	Amersham/Buchler, Braunschw.
Polymin P	BASF., Ludwigshafen
Salze	Merck, Darmstadt
Glasperlen	Dragon-Werk, Bayreuth
Cellugel-Streifen	Chemetron, Milano
Heparin	CIBA AG., Basel
Membranfilter	Sartorius, Göttingen
Harnstoff	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoäthanol	Fluka, Basel
Albumin	Armour Pharm.
Actinomycin	Bayer
Tris-Base	Merck, Darmstadt
EDTA, Pepton, Phenol	-"- -"
Sucrose, Enzyme grade	Mann Res., New York
Bakterien: E.coli B, A 19	Merck, Darmstadt
Phagen: T4	Dr.Rabussay
T5	Dr.Hofschneider
T7	-"-
M12	-"-
Silicon-Antischaum	Wacker-Chemie, München

V. Zusammenfassung

1. Das Plateau der RNA-Synthese bei niedriger Ionenstärke ist auf die Arretierung von Enzym an bestimmten Orten der DNA zurückzuführen.

Diese sind an T5- und T7-DNA mit den bei hoher Ionenstärke unter Bedingungen kontinuierlicher RNA-Synthese aktiven Terminationsorten (T_{HS}) identisch.

An T4-DNA sind sie hingegen von diesen verschieden.

Der Initiationsfaktor σ ist nach Arretierung bei niedriger Ionenstärke wieder am blockierten Enzym gebunden.

Bei niedriger Ionenstärke an T5- und T7-DNA arretierte Enzymmoleküle setzen die synthetisierte RNA frei.

Dies tritt nur dann ein, wenn die Anzahl der Enzymmoleküle im Transcriptionsansatz gleich der Anzahl der Terminationsorte an der DNA ist. Im Ueberschuss vom Enzym setzt nur dasjenige Enzymmolekül bei niedriger Ionenstärke sein Transcript frei, das den Terminator erreicht hat. Alle überschüssigen Enzymmoleküle laufen auf dieses auf und können ihre Transcribe nicht freisetzen.

An T4-DNA bleibt die RNA im blockierten Enzym-DNA-Komplex in jedem Falle gebunden.

Die Transcribe von T5- und T7-DNA, die bei niedriger und hoher Ionenstärke synthetisiert werden, sind identisch.

Dagegen ist die bei niedriger Ionenstärke von T4-DNA transkribierte RNA kürzer als die bei hoher Ionenstärke.

2. Ein neuer Blockierungsfaktor (κ) der Transcription wurde aus E.coli-Zellen isoliert und charakterisiert.

Dieses Protein hat ein Molekulargewicht von 17 000 pro Polypeptidkette. In TMA-Puffer liegt es als Dimer vor.

Der Faktor bindet an DNA in fast dichtester Packung.

In Gegenwart der Transcriptions-Blockierungsfaktoren κ und ρ werden an T4-, T5- und T7-DNA definiert kürzere RNA-Ketten synthetisiert als in Abwesenheit dieser Faktoren.

Der blockierte Zustand in Anwesenheit dieser Faktoren besteht aus einem Synthesekomplex von RNA, Enzym, DNA und Faktor. Die Orte an der DNA, an denen die RNA-Synthese blockiert wird, liegen vor den Salzterminationsorten.

Faktor ρ blockiert die RNA-Synthese nur bei niedriger Ionenstärke, κ bei allen Ionenstärken.

3. In der Initiation der Transcription wurden zwei neue Zustände gefunden.

Die langsame Plateau - Kinetik der RNA-Synthese bei niedriger Ionenstärke wird durch einen geschwindigkeitsbestimmenden Uebergang der sogenannten "verzögerten" in die sogenannten "unmittelbaren Starter" vor der Schliessung der ersten Internukleotid-Bindung verursacht.

Der Uebergang ist eine Reaktion erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von 3.5 Minuten für T5- und T7-DNA.

Dieser Uebergang ist bei hoher Ionenstärke wesentlich schneller.

4. Die Zerfallskinetik des Enzym-DNA-Komplexes in Gegenwart des Polyanions Heparin ist zweiphasig.

Die erste, schnelle Phase ist eine Kinetik erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von 60 Sekunden für T5-DNA.

Die zweite, langsamere Phase hat eine Halbwertszeit von über 100 Minuten.

Die schnell zerfallenden Enzym-DNA-Komplexe werden labile, die langsam zerfallenden stabile Komplexe genannt.

Der Anteil der labilen Komplexe ist für T5-DNA 30-40%, der Anteil der stabilen Komplexe 60-70%.

Beide Komplexe sind stark abhängig von der Ionenstärke.

Der Anteil der labilen Komplexe nimmt bei steigender Ionenstärke zu, der der stabilen Komplexe ab.

Die stabilen Komplexe bilden vermutlich diejenigen Enzymmoleküle, die an den Promotoren der DNA gebunden sind.

Die Natur der labilen Komplexe ist noch unbekannt.

5. An T5-DNA wurden 14 Terminationsorte gemessen.

Multipliziert man die mittlere Kettenlänge (Längenmittel) der T5-Transcripte mit der Anzahl Terminatoren, so erhält man eine transkribierte Region, die 100% der hybridisierbaren Fraktion der T5-DNA mit in vitro T5-Transcripten entspricht.

Die mittlere Anzahl T5-Transcripte pro Terminator, die von stabilen Komplexen aus synthetisiert werden, beträgt max. 27.

Aus diesen quantitativen Messungen und aus den Befunden von Blattner (68) wurde ein neues Modell des Promoters aufgestellt: Der Promoter besteht aus dem Eintrittsort, dem Präinitiator und dem Initiator.

Die Enzymmoleküle gelangen durch den Eintrittsort an der DNA in den Präinitiator, in dem für T5-DNA im Mittel bis zu 27 Enzymmoleküle Platz finden. Am Initiator beginnt die RNA-Synthese.

Der Uebergang der verzögerten in die unmittelbaren Starter hat nichts mit dem Uebergang der Enzymmoleküle vom Präinitiator in den Initiator zu tun.

6. Die Elongation ist höchstwahrscheinlich mit einem lokalen Schmelzen der DNA verbunden.

RNA-synthetisierendes Enzym liegt in der monomeren Form vor.

Aus den Kinetiken der Initiation und der RNA-Synthese an T4-DNA wurde eine Syntheserate von 60 Nukleotidresten pro Sekunde bestimmt. Die initiale Rate liegt bei 500 Nukleotidresten pro Sekunde.

7. Eine neue Polyribonukleotidpyrophosphorylase wurde aus E.coli isoliert und charakterisiert.

Sie besitzt ein Molekulargewicht von 20 000 pro Polypeptidkette. In TMA-Puffer liegt sie als Dimer vor. Sie ist ein basisches Enzym.

Sie benötigt zur Polynukleotid-Synthese einen RNA-Starter mit freien 3'-OH-Enden, der grösser als 3-5 Nukleotidreste sein muss. Sie besitzt ein definiertes Mg-Ionen-, K-Ionen- und pH-Optimum. Sie ist nicht durch Rifampicin hemmbar und relativ thermostabil. Sie katalysiert nicht die Pyrophosphorylyse von RNA. Während der Synthese oszilliert sie zwischen freien 3'-OH-Enden. Für ihre Bindung an t-RNA ergibt sich eine Komplexbildungskonstante von $8 \cdot 10^{-5}$. Ihr Syntheseprodukt verknüpft sie kovalent mit dem Starter. Das Verhältnis des Einbaues von ATP, UTP, GTP und CTP ist sehr stark Starter- (RNA-) und pH-abhängig. In geringer Masse polykondensiert sie Desoxyribonukleosidtriphosphate an nativer DNA.

8. Der neu isolierte Faktor χ aus E.coli-Zellen ist sehr wahrscheinlich ein Anti-Sigma-Faktor, der hohe Affinität zu σ besitzt.

9. Die Art der Hemmung des neu isolierten Proteins η aus E.coli-Zellen im Transcriptionsansatz ist noch unbekannt.
10. Eine neue Mikro-Präparation von hoch gereinigten S35- und C14-markierten RNA-Polymerasen wird in Material und Methoden beschrieben.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Abkürzungen von Zeitschriftentiteln, die nicht offiziell verwendet werden:

BBRC: Biochem.Biophys.Res.Communic.

JACS: J.Amer.Chem.Soc.

PNAS: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.

JMB: J.Mol.Biol.

JBC: J.Biol.Chem.

BBA: Biochim.Biophys.Acta

- 1) Avery, O.T., C.M. MacLeod und M. McCarty, J.exp.Med. 79 137 (1944)
- 2) Crick, F.A., Symp.Soc. Exp. Biol. The Biological Replication of Macromolecules XII, 138 (1958)
- 3) Crick, F.A., Nature 227, 561 (1970)
- 4) Brenner, S., Jacob, F. und Meselson, M., Nature 190, 576 (1961)
- 5) Chantrenne, H., The Biosynthesis of Proteins, Pergamon, New York, 1961
- 6) Hurwitz, J., Bressler, A., Diring, R., BBRC 3, 15 (1960)
- 7) Weiss, S.B., Gladstone, L., JACS 81, 4118 (1959)
- 8) Maitra, U., Hurwitz, J., PNAS 54, 815 (1965)
- 9) Bremer H., Konrad, M.W., Gaines, K. und Stent, G.S., JMB 13, 540 (1965)
- 10) Zillig, W., Fuchs, E., Millette, R., Procedures in Nucleic Acid Res., Harper and Row, New York, 1966, S.323
- 11) Zillig, W., Zechel, K., Halbwachs, H.I., Hoppe-Seyler's Z., Physiol.Chem. 351, 221 (1970)
- 12) Jacob, F., Monod, J.J., JMB 3, 318 (1961)
- 13) Jacob, F., Monod, J.J., BBRC 18, 693 (1965)
- 14) Davison, J., Pilarski, L.M., Echols, H., PNAS 63, 168 (1969)
- 15) Zubay, G., Schwartz, D., Beckwith, J., PNAS 66, 104 (1970)
- 16) Travers, A.A., Kamen, R.I., Schleif, R.F., Nature 228, 748 (1970)
- 17) Travers, A.A., Nature 225, 1009 (1970)
- 18) Green, M.H., PNAS 52, 1388 (1964)
- 19) Walter, G., Zillig, W., Palm, P. und Fuchs, E., Europ.J.Biochem. 3, 194 (1967)

- 20) Anthony, D.D., Zeszotek, E. und Goldthwait, D.A.,
PNAS 56, 1026 (1966)
- 21) Zechel, K., pers.Diskussion
- 22) Walter, G., Seifert, W. und Zillig, W., BBRC 30,
240 (1968)
- 23) Chamberlin, M., McGrath, J., Waskell, C., Nature 228,
227 (1970)
- 24) Roberts, J.W., Nature 224, 1168 (1969)
- 25) Burgess, R.R., JBC 244, 6160, 6168 (1969)
- 26) Priess, H., Zillig, W., BBA 140, 540 (1967)
- 27) Doerfler, W., Zillig, W., Fuchs, E., Albers, M.,
Z.Physiol.Chem. 330, 96 (1962)
- 28) Jones, O.W., Berg, P., JMB 22, 199 (1966)
- 29) Wood, W.B., Berg, P., JMB 9, 452 (1964)
- 30) Fuchs, E., Zillig, W., Hofschneider, H.P., Preuss A.,
JMB 10, 546 (1964)
- 31) Sethi, V.S., Zillig, W., FEBS Letters 8, 236 (1970)
- 32) Anthony, D.D., Goldthwait, D.A., BBA 204, 156 (1970)
- 33) Anthony, D.D., Wu, C.W., Goldthwait, D.A.,
Biochemistry 8, 246 (1969)
- 34) Remold-O'Donnell, E., Zillig, W., European.J.Biochem.
7, 318 (1969)
- 35) Zechel, K., Diss., Universität München 1971
- 36) Zillig, W., Zechel, K., Rabussay, D. Schachner, M.,
Sethi, V.S., Palm, P., Seifert, W., Heil, A.,
Coldspring Harbor Symp.Quant.Biol. 35, 47 (1970)
- 37) Hurwitz, J., Furth, J.J., Anders, M., Evans, A.,
JBC 237, 3752 (1962)
- 38) Fuchs, E., Millette, R.L., Zillig, W., Walter, G.,
Europ.J.Biochem. 3, 183 (1967)
- 39) Millette, R.L., Federation Proc. 28, 659 (1969)
- 40) Hurwitz, J., August, J.T., Prog.Nuc.Aci.Res. 1, 59
(1963)
- 41) Bremer, H., Kondrad, M.W., PNAS 51, 801 (1964)
- 42) Lill, U., Santo, R., Sippel, A., Hartmann, G.,
Inhibitors, Tools in Cell Res., S.48 (1969), Eds. Th.
Bücher und H. Sies, Springer Verlag, Berlin
- 43) Krakow, J.S., JBC 241, 1830 (1966)
- 44) Millette, R.L., Trotter, C.D., Herrlich, P.,
Schweizer, M., Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.
35, 135 (1970)
- 45) Richardson, J.P., JMB 49, 235 (1970)
- 46) Richardson, J.P., Nature 225, 1109 (1970)
- 47) Gillespie, D., Spiegelman, S., JMB 12, 829 (1965)

- 48) Jones, O.W., Berg, P., JMB 22, 199 (1966)
- 49) Bautz, E.K.F., Bautz, F.A., Nature 226, 1219 (1970)
- 50) Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J., Bautz, E.K.F., Nature 221, 43 (1969)
- 51) Mirault, M.E., Schärerrer, K. "Preprint"
- 52) Qasba, P.K., Zillig, W., European J.Biochem. 7, 315 (1969)
- 53) Kadoya, M., Mitsui, H., Tagaki, Y., OTAKA, E., Suzuki, H., Osawa, S., BBA 91, 36 (1964)
- 54) Fox, C.F., Gumpert, R.I., Weiss, S.B., JBC 240, 2101 (1965)
- 55) Walter, G., Seifert, W., Zillig, W., BBRC 30, 240 (1968)
- 56) Schachner, M., Seifert, W., Zillig, W., European J. Biochem. 22, 520 (1971)
- 57) Seifert, W., Robussay, D., Zillig, W., FEBS Letters 16, 175 (1971)
- 58) Bremer, H., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 109 (1970)
- 59) Goldberg, A.R., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 157 (1970)
- 60) Richardson, J.P., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 127 (1970)
- 61) Darlix, J.L., Sentenac, A., Fromageot, P., FEBS Letters 13, 165 (1971)
- 62) Traub, P., Zillig, W., Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem. 343, 246 (1966)
- 63) Fuchs, E., persönliche Diskussion
- 64) Freifelder, D., JMB 54, 567 (1970)
- 65) Seifert, W., 1. Lepetit Colloquium, Florenz (1969)
- 66) Seifert, W., Qasba, P., Walter G., Palm, P., Schachner, M., Zillig, W., European J. Biochem. 9, 319 (1969)
- 67) Rabussay, D., Diss. 1970
- 68) Blattner, F.R., Dahlberg, J.E., Boettiger, J.K., Fianadt, M., Szybalski, W., Nature N.B., im Druck (1972)
- 69) Florentiev, V.L., IVANOV, V.I., Nature 228, 519 (1970)
- 70) Hayashi, M., PNAS 54, 1736 (1965)
- 71) Hayashi, M., Hayashi, M.N., PNAS 55, 635 (1966)
- 72) Hayashi, M., Hayashi, M.N., PNAS 61, 1107 (1968)
- 73) Smith, D.A., Martinez, A.M., Ratliff, R.L., Williams, D.L., Hays, F.N., Biochemistry 6, 3057 (1967)
- 74) Richardson, J.P., PNAS 9, 75 (1969)
- 75) Krakow, J.S., Daley, K., Karstadt, M., PNAS 62, 432 (1969)

- 76) Sauerbier, W., Millette, R.L., Hackett jr., P.B.,
BBA 209, 368 (1970)
- 77) Grunberg-Manago, M., Ochoa, S., JACS 77, 3165 (1955)
- 78) August, J.T., Ortiz, P.J., Hurwitz, J., JBC 237,
3786 (1962)
- 79) Terzi, M., Cascino, A., Urbani, C., Nature 226,
1052 (1970)
- 80) Burma, D.P., Methods in Enzymology 12B, 576
- 81) RajBhandary, U.L., JBC 243, 556 (1968)
- 82) Zillig, W., Hölzel, H., Z.Physiol.Chem. 312, 140(1958)
- 83) Heil, A., Zillig, W., FEBS-Letters 11, 165 (1970)
- 84) Yphantis, D.A., Biochemistry 3, 297 (1964)
- 85) Fraser, D., Jerrel, E.A., JBC 205, 291 (1953)
- 86) Rabussay, D., Diss., München (1970)
- 87) Dische, Z., Mikrochemie 8, 4 (1930)
- 88) Burton, K., BIOCHEM. J. 62, 315 (1956)
- 89) Orcin, (s.M.Schachner, Diss., München, 1970)
- 90) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.
JBC 193, 265 (1951)
- 91) Lämmli, U.K., Nature 227, 680 (1970)
- 92) Mirault, M.E., Schärer, K., European J. Biochem.
23, 372 (1971)
- 93) Zechel, K., Diss., München (1971)

MEIN DANK GILT:

- Herrn Prof. Dr.Dr. P.H.Hofschneider für die Ueberlassung von diversen E.coli-Stämmen und Phagenlysaten.
- Herrn Dr. H. Priess für die analytische Ultrazentrifugation.
- Meiner Mutter, Frau L.Schäfer-Burkhard, für das Abschreiben der Arbeit.
- Dem Fonds für wissenschaftliche Ausbildung c/o.Firma CIBA-GEIGY AG., Basel (Schweiz).
- Der Max-Planck-Gesellschaft für ein zweijähriges Stipendium.

LEBENS LAUF von Rolf Schäfer-Häcki,
Bürger von Basel-Stadt.

- 8.3.1945 geboren in Chemnitz(DDR).
- 1951-1955 Besuch der Volksschule in Wiesbaden(BRD).
und der Primarschule in Basel(Schweiz).
- 1955-1966 Besuch der Gymnasien in Basel und Bochum-Gerthe.
- 1964 Englisch-Studium am Cheshunt-College in
Cambridge(England).
- 1966 Reifeprüfung.
- 1966-1970 Studium der Chemie an der Universität Basel.
- 1967-1970 Partielle Lehrtätigkeit an einem Gymnasium in
Basel in den Fächern Mathematik, Physik und
Chemie.
- 1967 1. Vordiplom.
- 1969 2. Vordiplom (Nebenfächer).
- 1969/1970 Diplomarbeit bei Prof.S.Fallab und Prof.C.Grob:
1. Synthese von Metallfluorselenaten,
2. Synthese von Anti-2-(N-methyl-decahydro-cis-
und trans-trans-chinolyl)-phenyl-oximino-
para-methyl-tolyl-sulfonat.
- 1968/1969 Ausarbeitung von Trennverfahren zur Reinigung
biologisch oxydierter Cortisone c/o.CIBA AG.,
Basel, und Entwicklung biologisch abbaubarer
Tenside c/o.Forschungslabor W.Schäfer,Binningen
(Baselland).
- 1970 Diplom-Prüfung in Chemie
- 1970-1972 Doktor-Arbeit am Max-Planck-Institut für Bio-
Chemie, München, unter Anleitung von Prof. Dr.
W.Zillig.

